

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ,
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΖΩΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Βιοϋμένια παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών
σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων»

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΟΛΕΣΚΑΣ

ΒΟΛΟΣ 2023

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT,
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION

INTERDEPARTMENTAL POSTGRADUATE PROGRAMME
“TECHNOLOGY, QUALITY AND SAFETY OF ANIMAL ORIGIN
FOODS”

POSTGRADUATE MASTER’S THESIS

“Biofilm of food-borne pathogens and spoilage microorganisms on
food contact surfaces”

APOSTOLOS KOLESKAS

VOLOS 2023

«Βιοϋμένια παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε
επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1) **Ιωάννης Μποζιάρης**, Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**,
- 2) **Ιωάννης Γιαβάσης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιοτεχνολογία Τροφίμων και Μικροβιακή φυσιολογία, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3) **Φωτεινή Παρλαπάνη**, Επίκουρος Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων – Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Ιωάννη Γιαβάση και Φωτεινή Παρλαπάνη για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Δημήτριο Αναγνωστόπουλο για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του, όσον αφορά στην προμήθεια εργαστηριακού υλικού, καθώς επίσης και τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Αθανάσιο Τσιαρτσάφη και την κα Ευαγγελία Καραμάνη για την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διεξήχθη στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Τεχνολογία Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης» των Τμημάτων Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος και Επιστήμης και Διατροφής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Σκοπός της διατριβής ήταν η παρακολούθηση της ανάπτυξης βιοϋμενίου του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* σε επιφάνειες από πολυστυρένιο προσομοιώνοντας τις πραγματικές συνθήκες μιας μονάδας επεξεργασίας αλιευμάτων.

Προκειμένου να διεκπεραιωθεί ο σκοπός, λήφθηκαν τσιπούρες από τις οποίες παρασκευάστηκε ο ζωμός ιχθύος, ο οποίος αποτέλεσε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βιοϋμενίου του *Listeria monocytogenes* σε επιφάνειες από πολυστυρένιο (μικροπλακέτα). Το συγκεκριμένο υλικό χρησιμοποιείται στην συσκευασία τροφίμων. Κατά το πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν έξι στελέχη *Listeria monocytogenes* (L128, L129, L206, L207, L131, L133) και δύο είδη *Pseudomonas* (*Pseudomonas gessardii* και *Pseudomonas fragi*) σε αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος διότι σκοπός ήταν η ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μόνοκαλλιέργεια αλλά και μικτή καλλιέργεια. Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μικτή καλλιέργεια των έξι στελεχών *Listeria monocytogenes* σε ζωμό ιχθύος διότι σκοπός ήταν να μελετηθεί η ανάπτυξη βιοϋμενίου του *Listeria monocytogenes* σε συνδυασμό με τη φυσική μικροχλωρίδα της τσιπούρας. Η συνολική διάρκεια των πειραμάτων ήταν δέκα ημέρες σε θερμοκρασία 8°C προσμοιάζοντας όσο το δυνατόν περισσότερο τις συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία ιχθύων στη βιομηχανία. Η συγκεκριμένη μελέτη

έδειξε πως όταν το *Listeria monocytogenes* σε συγκαλλιέργεια με τα *Pseudomonas* παρουσιάζει πιο αργή ανάπτυξη και χαμηλότερους τελικούς πληθυσμούς από ότι σε μονοκαλλιέργεια. Αντιθέτως όταν το *Listeria monocytogenes* αναπτυχθεί με την φυσική μικροχλωρίδα της τσιπούρας παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη ανάπτυξη. Συμπερασματικά διαπιστώνεται πως κύτταρα του *Listeria monocytogenes* και διάφορων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών μπορούν να βρεθούν στην βιομηχανία γεγονός που διαδραματίζει σημαντικό διότι η φυσική μικροχλωρίδα ιχθύων τσιπούρας ενισχύει την ανάπτυξη βιοϋμενίου του *Listeria monocytogenes*. Αυτό καταδεικνύει την ανάγκη ολιστικής τήρησης των ορθών υγιεινών πρακτικών στη βιομηχανία τροφίμων για να αποφευχθεί το φαινόμενο αυτό.

Λέξεις κλειδιά: Βιοϋμένιο, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, Επιφάνεια επεξεργασίας τροφίμων, Πολυστυρένιο

Abstract

The present thesis was conducted within the framework of the Interdepartmental Postgraduate Programme of Studies "Quality and Safety Technology of Food of Animal Origin" of the Departments of Agriculture, Aquaculture and Aquatic Environment and Nutrition Science and Science of the University of Thessaly. The aim of the thesis was to monitor the biofilm growth of the pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* on polystyrene surfaces simulating the real conditions of a fish processing unit.

In order to accomplish the purpose, sea bream were obtained from which fish broth was prepared, which served as the nutrient for the growth of *Listeria monocytogenes* biofilm on polystyrene (microplate) surfaces. This material is used in food packaging. In the first experiment, six strains of *Listeria monocytogenes* (L128, L129, L206, L207, L131, L133) and two *Pseudomonas* species (*Pseudomonas gessardii* and *Pseudomonas fragi*) were used in sterile fish broth because the aim was to develop a biofilm in single culture and mixed culture. In the second experiment, a mixed culture of the six *Listeria monocytogenes* strains in fish broth was used because the aim was to study the growth of *Listeria monocytogenes* biofilm in combination with the natural microflora of sea bream. The total duration of the experiments was ten days at a temperature of 8°C, approximating as closely as possible the conditions prevailing in fish processing in the industry. This study showed that when *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Pseudomonas* shows slower growth and lower final populations than in monoculture. In contrast, when *Listeria monocytogenes* is grown with the natural microflora of sea bream it shows much higher growth. In conclusion, it can be concluded that cells of *Listeria*

monocytogenes and various pathogenic microorganisms can be found in the industry which is important because the natural microflora of sea bream fish enhances the growth of *Listeria monocytogenes* biofilm. This demonstrates the need for holistic compliance with good hygienic practices in the food industry to avoid this phenomenon.

Key words: Biofilm, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, Food processing surface, Polystyrene

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	i
Abstract	iii
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Χαρακτηριστικά Βιοϋμενίου	1
1.2 Ιστορική Αναδρομή	4
1.3 Στάδια ανάπτυξης βιοϋμενίου	5
1.3.1 Μεταφορά και Αρχική Αντιστρεπτή Προσκόλληση	6
1.3.2 Μη-Αντιστρεπτή Προσκόλληση και Σχηματισμός Μικροαποικιών	6
1.3.3 Ανάπτυξη και Ωρίμανση βιοϋμενίου	8
1.3.4 Αποκόλληση και Διασπορά των Κύτταρων.....	8
1.5 Εξωπολυσακχαριτικό Στρώμα (Extracellular Polymeric Substances, EPS).....	9
1.6 Επικοινωνία Κύτταρων (Cell To Cell Communication).....	10
1.7 Απολυμαντικές Ουσίες	11
1.8 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.8.1 Χαρακτηριστικά <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.8.2 Πρόκληση ασθενειών	13
1.8.3 <i>Listeria monocytogenes</i> στη βιομηχανία	14
1.8.4 Νομοθεσία του <i>Listeria monocytogenes</i>	16
1.9 Σκοπός	17
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	18
2.1 Προετοιμασία Ζωμού Ιχθύος (Fish Juice, F.J.)	18
2.2 Προετοιμασία Καλλιιεργειών	18
2.3 Πειραματικός Σχεδιασμός	20
2.3 Θρεπτικά Υλικά.....	21
3. Αποτελέσματα	23
3.1 Παρατήρηση ανάπτυξης μικροβιακού πληθυσμού βιοϋμενίου σε αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος.....	23
3.1.1 Παρατήρηση ανάπτυξης βιοϋμενίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε μονοκαλλιέργεια	23
3.1.2 Παρατήρηση ανάπτυξης βιοϋμενίου <i>Pseudomonas</i> σε μονοκαλλιέργεια	24
3.1.3 Παρατήρηση ανάπτυξης βιοϋμενίου συγκαλλιέργειας <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Pseudomonas</i>	24
3.2 Παρατήρηση ανάπτυξης πληθυσμού βιοϋμενίου σε μη αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος εμβολιασμένου ή όχι με <i>Listeria monocytogenes</i>	27
4. Συζήτηση	32

5.Συμπεράσματα.....	37
6. Βιβλιογραφία.....	39
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	39
Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία	49

1. Εισαγωγή

1.1 Χαρακτηριστικά Βιοϋμενίου

Με τον όρο βιοϋμένια ή βιομεμβράνες (biofilm), εννοούμε κοινότητες μικροβίων, οι οποίες βρίσκονται προσκολλημένες πάνω σε μία επιφάνεια με την παρουσία ή μη θρεπτικών συστατικών. Αυτές περικλείονται από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (extracellular polymeric substances, EPS) (Toyofuku et al. 2016). Ως EPS ορίζονται ενυδατωμένα πολυμερή (εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες) που εκκρίνουν τα κύτταρα και αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα (RNA, DNA), αμινοξέα, γλυκοπρωτεΐνες, φωσφοπρωτεΐνες, σάκχαρα, φωσφολιπίδια, ουρονικά οξέα και φαινολικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να βρίσκονται σε διαφορετικές ποσότητες που εξαρτώνται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την ηλικία του βιοϋμενίου και τον τύπο των μικροοργανισμών που εμπλέκονται (Carpentier, 2014, Korber et al., 2009, Lebleux et al., 2020). Τα βιοϋμένια αποτελούν μια κοινότητα, η οποία αποτελείται από μικροβιακά κύτταρα, που είναι συνδεδεμένα με ένα υπόστρωμα ή μεσεπιφάνεια ή μεταξύ τους. Περικλείονται σ' ένα υλικό εξωκυττάρων πολυμερών ουσιών που παράγεται από τα ίδια και παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο σχετικά με το ρυθμό ανάπτυξης και τη γονιδιακή έκφραση (Donlan & Costerton, 2002). Χαρακτηρίζονται δηλαδή ως συσσωματωμένα μικροβιακά κύτταρα που περιβάλλονται από μία αυτοπαραγόμενη πολυμερή μήτρα (self-produced polymer matrix). Τα βιοϋμένια μπορεί να αποτελούνται από περισσότερα από ένα είδος μικροοργανισμού. Πρώτη φορά μελετήθηκαν από τον Ολλανδό Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723) το 1683-1708 και έπειτα μελετήθηκαν και από τον Louis Pasteur (1822-1895).

Αβιοτικές και βιοτικές επιφάνειες παρέχουν τις κατάλληλες συνθήκες, όπως για παράδειγμα θρεπτικά συστατικά, ενεργότητα νερού, θερμοκρασία, pH, για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων (Korber et al., 2009). Η προσκόλληση μικροοργανισμών σε επιφάνειες οι οποίες έρχονται σε επαφή με τρόφιμα και ο επακόλουθος σχηματισμός βιοϋμενίων θεωρούνται ανεπιθύμητα στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς η απόσπαση κυττάρων από τη δομή του βιοϋμενίου είναι πιθανό να οδηγήσει σε διασταυρούμενη επιμόλυνση, ειδικά στα στάδια μετά την επεξεργασία, προκαλώντας αλλοίωση και αμφισβήτηση της τελικής ασφάλειας του προϊόντος (Giaouris et al., 2013, Lianou et al., 2020, Tristezza et al., 2010, Wirtanen and Salo, 2016).

Οι μικροοργανισμοί λόγω των ιδιοτήτων τους, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε οποιαδήποτε επιφάνεια οργανικές-ανόργανες (γυαλί, πλαστικό, μέταλλο, άνθρωπος, ζώα κλπ). Ειδικότερα μπορούν να αναπτυχθούν σε οποιοδήποτε περιβάλλον με απαραίτητη προϋπόθεση την παρουσία θρεπτικού υποστρώματος. Τα βιοϋμένια παρουσιάζονται σε πολλά οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων των ευκαρυωτικών ιστών, αλλά και επιφάνειες φυσικής ή ανθρωπογενής προελεύσεως (Costerton et al., 1994). Η παρουσία των βιοϋμενίων έχει παρατηρηθεί σε ποικίλα ενδιαιτήματα συμπεριλαμβανομένου του τομέα της βιομηχανίας επεξεργασίας τροφίμων. Ο σχηματισμός των βιοϋμενίων από τους μικροοργανισμούς μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή και την επεξεργασία πολλών τροφίμων και ποτών ως προς την ασφάλεια και την ποιότητα τους (Korber et al., 2009). Μερικά παραδείγματα ανάπτυξης βιοϋμενίων είναι: η οδοντική πλάκα, η ανάπτυξη τους στα ύφαλα των καραβιών (ship fouling), στα δίχτυα των ιχθυοκαλλιεργειών (bio fouling), σε ιατρικά εργαλεία, σε μονάδες επεξεργασίας τροφίμων, ακόμα και σε σωλήνες συστημάτων ύδρευσης. Πιο

συγκεκριμένα στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων στα σημεία που οι επιφάνειες της μονάδας έρχονται σε επαφή με το τρόφιμο (μηχανήματα, πάγκοι επεξεργασίας, χώροι αποθήκευσης, συσκευασία κλπ.) αλλά και σε σημεία τα οποία δεν υπάρχει άμεση επαφή (πάτωμα, αρδευτικό δίκτυο, τοίχοι κλπ.) (Kells & Gilmour, 2004). Το κομμάτι το οποίο απασχολεί την βιομηχανία σε μεγάλο βαθμό είναι οι συνεχείς επιμολύνσεις των επιφανειών, το οποίο επιφέρει ως απόρροια την υποβάθμιση της ποιότητας και της ασφάλειας των προϊόντων (Sharman & Anand, 2002). Η ακριβής χημεία και φυσιολογία των βιοϋμενίων ποικίλει και σχετίζεται τόσο με τη φύση των μικροοργανισμών όσο και με το περιβάλλον στο οποίο διαβιώνουν. (Lewandowski, 2000).

Διάφορες έρευνες αποδεικνύουν την ανάπτυξη βιοϋμενίων στις επιφάνειες διαφόρων μονάδων επεξεργασίας τροφίμων όπως την ανάπτυξη βιοϋμενίων από διάφορα είδη *Pseudomonas spp.* σε μονάδα που επεξεργαζόταν χαβιάρι (Bagge-Ravn et al. 2003), σε μονάδα επεξεργασίας γαρίδων (Guobjornsdottir et al. 2005), στην ταινία μεταφοράς παγωτών παρατηρήθηκε ανάπτυξη βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* (Gunduz and Tuncel, 2006). Βάση των παραπάνω ερευνών παρατηρείται πως η εμφάνιση βιοϋμενίων από διάφορους μικροοργανισμούς γίνεται σε διάφορες επιφάνειες εξοπλισμού των μονάδων επεξεργασίας τροφίμων καθ' όλη την γραμμή παραγωγής. Επίσης, υποδεικνύεται πως τα βιοϋμένια μπορεί να αποτελούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς όπως το *Listeria monocytogenes* το οποίο είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες επιμόλυνσης των τροφίμων και υποβάθμισης της ποιότητας της αλλά και της πρόκλησης τροφοδηλητηριάσεων.

Για τον περιορισμό ανάπτυξης των βιοϋμενίων, την διατήρηση της ποιότητας καθώς και της ασφάλειας των τροφίμων αναπτύχθηκαν κάποια πρωτόκολλα που

χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία των τροφίμων όπως είναι η ορθή υγιεινή πρακτική (Good Hygiene Practices, GHP), η ορθή βιομηχανική πρακτική (Good Manufacturing Practices, GMP) και η ανάλυση κινδύνων κρίσιμων σημείων ελέγχου (Hazard Analysis Critical Control Points, HACCP). Επιπλέον άλλη μια τεχνική καθαρισμού πλήρων στοιχείων κυκλωμάτων εγκαταστάσεων ή αγωγών χωρίς αποσυναρμολόγηση ή άνοιγμα του εξοπλισμού και με ελάχιστη ή καθόλου χειρωνακτική συμμετοχή από την πλευρά του χειριστή (Cleaning In Place, CIP) η οποία χρησιμοποιείται στην βιομηχανία γάλακτος, βοηθάει στην επίτευξη ενός ασφαλέστερου περιβάλλοντος απαλλαγμένο από βιοϋμένια (Kumar & Anand, 1998).

1.2 Ιστορική Αναδρομή

Ο Ολλανδός Antony van Leeuwenhoek ήταν από τους πρώτους ο οποίος παρατήρησε και περιέγραψε την ύπαρξη των βιοϋμενίων στα δόντια του (1632-1723). Παρατήρησε συσσωρευμένους μικροοργανισμούς στην επιφάνεια των δοντιών του και από κομμάτια της γλώσσας. Κάποια χρόνια αργότερα ο Louis Pasteur (1822-1895) παρατήρησε και απεικόνισε συσσωματώματα βακτηρίων ως υπεύθυνα για την μετατροπή του κρασιού σε οξικό οξύ. Για τον επόμενο αιώνα περίπου δεν υπήρχε σημαντική εξέλιξη στην μελέτη των βιοϋμενίων. Το 1977, δημοσιεύτηκε η πρώτη φωτογραφία η οποία απεικόνιζε συσσωρευμένα κύτταρα στα πτύελα ασθενών οι οποίοι έπασχαν από χρόνια κυστική ίνωση στους πνεύμονες (χρόνια μόλυνση του αναπνευστικού) από *Pseudomonas aeruginosa* (Høiby et al. 1974).

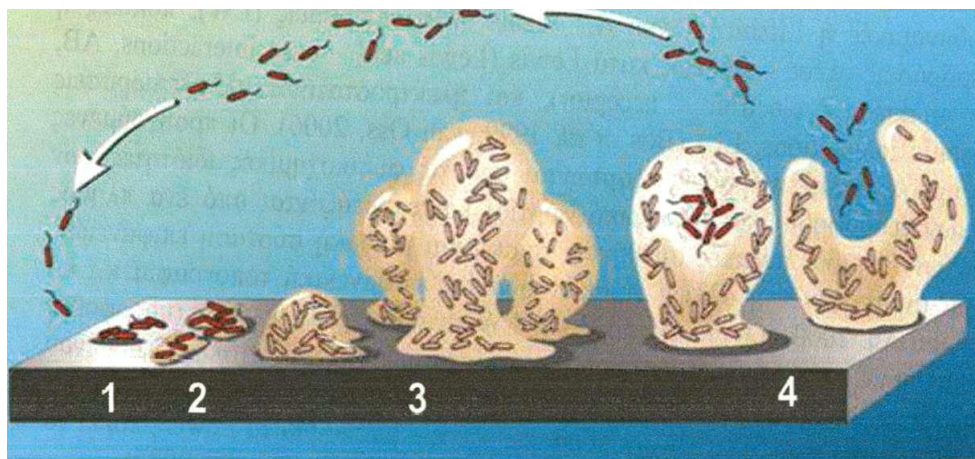
Μέχρι το 1987 θεωρούσαν και περιέγραφαν τα βιοϋμένια ως «πλάκες» οργανικού υλικού, όπου τα ακινητοποιημένα βακτήρια (sessile bacteria) παρατηρούνταν ενσωματωμένα σε τυχαίες θέσεις. Επίσης με την τεχνολογική

ανάπτυξη και την χρήση του σύγχρονου μικροσκοπίου σάρωσης με ακτίνες laser (confocal laser scanning microscope, C.L.S.M) μπόρεσε να απαντηθεί το ερώτημα πως λαμβάνουν θρεπτικά στοιχεία και οξυγόνο ενσωματωμένα κύτταρα βαθιά μέσα στο βιοϋμένιο. Επίσης χάρει στο C.L.S.M. και τις τρισδιάστατες εικόνες που παρείχε έδειξε ότι οι μικροαποικίες που αναπτύσσονται διαχωρίζονται από κανάλια ύδατος (Caldwell et al. 1992, Kuehn et al. 1998).

1.3 Στάδια ανάπτυξης βιοϋμενίου

Προκειμένου να σχηματιστεί ένα βιοϋμένιο πραγματοποιούνται τα ακόλουθα στάδια:

1. μεταφορά και αρχική αντιστρεπτή προσκόλληση
2. μη-αντιστρεπτή προσκόλληση και σχηματισμός
3. ανάπτυξη και ωρίμανση του βιοϋμενίου
4. αποκόλληση και διασπορά των κυττάρων



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της εξελικτικής πορείας ενός βιοϋμενίου. **1:** προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια (attachment), **2:** παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (extracellular polymeric substances, EPS), **3:** ανάπτυξη και ωρίμανση της βιο-υμενικής αρχιτεκτονικής (growth and maturation of biofilm architecture), **4:** αποκόλληση κυττάρων από το βιοϋμένιο (detachment) (Center for Biofilm Engineering, Montana State University, USA, <http://www.erc.montana.edu>).

1.3.1 Μεταφορά και Αρχική Αντιστρεπτή Προσκόλληση

Το πρώτο στάδιο αρχίζει με την μεταφορά μικροβιακών κυττάρων στην επιφάνεια, μέσω της έμφυτης κινητικότητας που εμφανίζεται σε ορισμένα βακτήρια είτε με την δύναμη της βαρύτητας είτε μέσω φυσικών δυνάμεων (κίνηση Brown). Πολλά βακτήρια έχουν μαστίγια (flagella) τα οποία είναι υπαίτια για την κίνηση τους (Moens and Vanderlayden, 1996). Έχει βρεθεί ότι τα μαστίγια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κίνηση και μεταφορά κυττάρων *Escherichia coli* σε αβιοτικές επιφάνειες (Pratt and Kolter, 1998). Όσον αφορά το *Listeria monocytogenes* τα μαστίγια βοηθούν στην αρχική του προσκόλληση σε επιφάνειες από γυαλί και σε ανοξείδωτο χάλυβα (Vatanyooaisarn et al. 2000, Lemon et al. 2007). Στο *Salmonella Typhimurium* έχει παρατηρηθεί πως η ύπαρξη ή μη μαστιγίων δεν επηρεάζει την ποσότητα των κυττάρων που προσκολλώνται πάνω σε επιφάνειες από πολυστυρένιο ή γυαλί (Rombling and Rohde, 1999). Γενικά η κινητικότητα βοηθάει την μεταφορά των βακτηριακών κυττάρων σε διάφορες επιφάνειες για την δημιουργία και ανάπτυξη βιοϋμενίων, αλλά η ύπαρξη μαστιγίων δεν είναι υποχρεωτικός παράγοντας για την ανάπτυξη τους καθώς πολλά θετικά κατά Gram βακτήρια δεν παρουσιάζουν κινητικότητα και παρόλα αυτά αναπτύσσουν βιοϋμένια, όπως για παράδειγμα είδη των γενών *Streptococcus*, *Staphylococcus* και *Lactococcus* (Gotz, 2002, Yoshida and Kuramitsu, 2002, Luo et al. 2005).

1.3.2 Μη-Αντιστρεπτή Προσκόλληση και Σχηματισμός Μικροαποικιών

Μετά την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε μία επιφάνεια μέσω της αντιστρεπτής προσκόλλησης τα βακτηριακά κύτταρα πρέπει να συνεχίσουν να βρίσκονται προσκολλημένα στη θέση τους για να μπορέσουν να αναπτυχθούν-πολλαπλασιαστούν με σκοπό τη δημιουργία του βιοϋμενίου. Η μετάβαση από την αντιστρεπτή στην μη-αντιστρεπτή προσκόλληση έχει αποδοθεί πριν από αρκετά

χρόνια (Zobell, 1943), και θεωρείται ως μεταβολή μιας κατάστασης από χαλαρή αλληλεπίδραση ενός μικροβιακού κυττάρου με την επιφάνεια προσκόλλησης σε μία πιο μόνιμη-σταθερή σύνδεση-αλληλεπίδραση.

Επίσης, πρέπει να επισημανθεί ότι στο στάδιο αυτό για την προσκόλληση των μικροοργανισμών συμβάλλουν σημαντικά και κάποια πρωτεϊνικά οργανίδια τα τριχίδια. Ένα παράδειγμα είναι πως τα τριχίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη βιοϋμενίου της *Pseudomonas aeruginosa* (O' Toole and Kolter, 1998a). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως στις *Salmonella* Enteritidis και *Typhimurium* τα τριχίδια τους συμβάλλουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων αλλά και στην δημιουργία συσσωμάτων (Austin et al. 1998, Romling et al. 2000, Woodward et al. 2000, Gerstel and Romling, 2003, White et al. 2006).

Ένα από τα χαρακτηριστικά των βιοϋμενίων είναι οι εξωτερικές πολυμερές ουσίες EPS όπου διαχωρίζουν τα βιοϋμένια από άλλα προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα πάνω σε μία επιφάνεια-υπόστρωμα (Wingender et al. 1999). Τα βακτηριακά κύτταρα που συναντώνται στο υπόστρωμα προσκολλούνται μεταξύ τους κατά τη διάρκεια του σταδίου της μη-αντιστρεπτής προσκόλλησης δημιουργώντας έτσι συσσωματώματα κυττάρων (cell aggregates), όπως για παράδειγμα η παραγωγή ενός πολυσακχαρίτη (polysaccharide intercellular adhesin, P.I.A) από το *Staphylococcus epidermidis*, ο οποίος πολυσακχαρίτης συνδέει τα κοντινά κύτταρα μεταξύ τους διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την δημιουργία μικροαποικιών και στην συνέχεια του βιοϋμενίου (Mack et al. 1994, Heilmann et al. 1996). Πρέπει να επισημανθεί πως υπάρχει η πιθανότητα ένας μικροοργανισμός ο οποίος βρίσκεται ήδη σε μία επιφάνεια να επηρεάσει την αποίκηση κάποιου άλλου είδους στην ίδια επιφάνεια (Leriche et al. 1999, Leriche and Carpentier, 2000, Hassan et al. 2004).

1.3.3 Ανάπτυξη και Ωρίμανση βιοϋμενίου

Το τρίτο στάδιο είναι η ωρίμανση και ανάπτυξη του βιοϋμενίου. Με την τεχνολογική ανάπτυξη και την βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δόθηκε η δυνατότητα να μελετηθούν εκτενέστερα τα βιοϋμένια και η δομή τους αλλά και η ποικιλομορφία των ώριμων βιοϋμενίων: ορισμένα είναι επίπεδα, άλλα παρουσιάζουν κοιλότητες με καλύτερη οργάνωση ενώ άλλα έχουν σχήμα μανιταριού και κανάλια για την κυκλοφορία των υγρών (Lawrence et al. 1991, Stoodley et al. 1994, Stoodley et al. 2002).

Τα προσκολλημένα κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα ανόργανα και οργανικά στοιχεία της επιφάνειας που έχουν προσκολληθεί το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη τους άρα και την πολυπλοκότητα και την πυκνότητα του βιοϋμενίου. Σημαντικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζει ο γλυκοκάλικας που σχηματίζεται. Η ανάπτυξη και ωρίμανση του βιοϋμενίου επηρεάζεται άμεσα από το γύρω περιβάλλον του και πιο συγκεκριμένα απ' την διαθεσιμότητα των θρεπτικών αλλά και από άλλους παράγοντες όπως η μεταφορά των θρεπτικών σε όλα τα σημεία του βιοϋμενίου αλλά και την απομάκρυνση των μεταβολικών προϊόντων, όπως επίσης από την διάχυση του νερού και του οξυγόνου, το pH και την θερμοκρασία (Costerton et al. 1995).

1.3.4 Αποκόλληση και Διασπορά των Κύτταρων

Το τελευταίο στάδιο είναι η αποκόλληση και διασπορά των κυττάρων. Με τον όρο αποκόλληση εννοείται η απελευθέρωση μεμονωμένων κυττάρων ή η απελευθέρωση σαν ομάδες το οποίο αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον κύκλο ζωής ενός βιοϋμενίου. Στην διάρκεια αυτού του σταδίου τα βακτηριακά κύτταρα που έχουν αποκολληθεί από το βιοϋμένιο επανέρχονται στην πλαγκτονική τους μορφή με σκοπό την εύρεση και αποίκηση μιας νέας επιφάνειας πιο ευνοϊκής για την δημιουργία και την ανάπτυξη ενός νέου βιοϋμενίου.

Η αποκόλληση των κυττάρων μπορεί να γίνει είτε παθητικά (μέσω υδροδυναμικών δυνάμεων) (Stoodley et al. 2002), είτε ενεργητικά (μέσω φυσιολογικής ρύθμισης). Μία περίπτωση ενεργητικής αποδέσμευσης κυττάρων είναι η ενζυμική πέψη των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών. Έχει αποδειχθεί πως σε βιοϋμένια της *Pseudomonas aeruginosa* και *Actinobacillus actinomycetemcomitans* τα ένζυμα που συμβάλλουν στην αποδέσμευση των κυττάρων είναι η λυάση του αλγινικού και η διασκορπισίνη DspB (Boyd and Chakrabarty, 1994, Kaplan et al. 2003). Επίσης, έχει βρεθεί πως σε βιοϋμένια από *Pseudomonas fluorescens* έπειτα από συνεχόμενη και εκτεταμένη παραγωγή κυττάρων επήλθε η αποδέσμευση τους με ταυτόχρονη μείωση των εξωκυτταρικών ουσιών (Alison et al. 1998).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που λαμβάνει χώρα η διαδικασία της αποκόλλησης είναι η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων το οποίο οδηγεί τα βακτήρια στην εύρεση ενός νέου πλουσιότερου σε θρεπτικά στοιχεία υποστρώματος (O'Toole et al. 2000). Η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων ονομάζεται και θρεπτικό στρες και έχει αποδειχθεί πως η έλλειψη άνθρακα στην *Pseudomonas putida* επηρεάζει την κολλητική ικανότητα των κυττάρων (Gjermansen et al. 2005) ενώ η έλλειψη θρεπτικών στην *Pseudomonas fluorescens* προκαλεί αποδέσμευση κυττάρων από γυάλινες επιφάνειες (Delaquis et al. 1989).

1.5 Εξωπολυσακχαριτικό Στρώμα (Extracellular Polymeric Substances, EPS)

Όσον αφορά την δομή των βιοϋμενίων, τα βακτηριακά κύτταρα που τα δημιουργούν παράγουν τις εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS) οι οποίες δημιουργούνται παρουσίας νερού. Οι εξωπολυσακχαρίτες αποτελούνται κυρίως από DNA, RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα. Κοινό

χαρακτηριστικό όλων των βιοϋμενίων είναι ότι οι οργανισμοί βρίσκονται βυθισμένοι σε μία μήτρα (matrix) εξωκυττάρων πολυμερών ουσιών (EPS) μικροβιακής προελεύσεως (Flemming, 2002). Το δίκτυο των EPS μπορεί να αλληλεπιδράσει με το περιβάλλον και είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση διαλυμένων ενώσεων και τη δέσμευσή τους στο βιοϋμένιο, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό θρεπτικά συστατικά στους μικροοργανισμούς (Flemming et al., 2007). Ένα χαρακτηριστικό τους είναι η μηχανική σταθερότητα που προσδίδουν, επίσης βοηθούν και στην προσκόλληση των βιοϋμενίων στις επιφάνειες (Flemming & Wingender, 2010), ενώ ευθύνονται για το 50-90% του ολικού οργανικού άνθρακα του βιοϋμενίου (Flemming et al., 2000). Έχει αποδειχθεί πως οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS) βοηθούν στην προσκόλληση κυττάρων στο επιθήλιο του εντέρου εφόσον έχουν παραχθεί από προβιοτικά στελέχη (Ruas-Madiedo et al. 2006), ενώ η παραγωγή τους από οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) που χρησιμοποιούνται από την γαλακτοβιομηχανία βοηθάνε στη σύσταση, υφή, δομή των προϊόντων ζύμωσης (de Vuyst and Degeest 1999, Jolly et al. 2002, Welman and Maddox, 2003).

1.6 Επικοινωνία Κύτταρων (Cell To Cell Communication)

Έχει αποδειχθεί πως η ανάπτυξη, η ωρίμανση και η διασπορά ενός βιοϋμενίου μπορεί να ρυθμιστεί μέσω της έκφρασης διαφόρων γονιδίων η οποία εξαρτάται από τον πληθυσμό και από μόρια που παράγουν σήματα μεταξύ των κυττάρων (cell to cell signaling molecules) (Fuqua et al. 1994, McLean et al. 1997, Davies et al. 1998, Fuqua and Greenberg, 2002, Shirliff et al. 2002). Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (cell to cell communication) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση και την διαφοροποίηση των κυττάρων σε ένα βιοϋμένιο ανάλογα με συνθήκες που επικρατούν. Τα βακτήρια επικοινωνούν μεταξύ τους χρησιμοποιώντας διάφορα σήματα χημικών ενώσεων (chemical signals compounds). Ένας τύπος επικοινωνίας

που χρησιμοποιούν για την ρύθμιση της πυκνότητας του πληθυσμού του βιοϋμενίου είναι το Quorum sensing (QS), το οποίο συμβάλλει στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του (Fuqua et al. 1994). Έχει αποδειχθεί πως το QS σύστημα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του βιοϋμενίου για τα: *Streptococcus mutans* (Li et al. 2002), *Pseudomonas putida* (Steidle et al. 2001) και *Salmonella* spp. (Prooty et al. 2002).

1.7 Απολυμαντικές Ουσίες

Προκειμένου να αποφευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων σε μία επιφάνεια, κρίνεται αναγκαίο να υπάρχει μία στρατηγική πρόληψης. Η απολύμανση και ο καθαρισμός είναι η κύρια στρατηγική για την πρόληψη και αντιμετώπιση ενός βιοϋμενίου, πριν γίνει ισχυρή προσκόλληση των βακτηρίων στις επιφάνειες (Simões et al., 2010). Η απομάκρυνση ή αδρανοποίηση των μικροοργανισμών που βρίσκεται στις επιφάνειες του εξοπλισμού γίνεται μέσω φυσικών ή χημικών μεθόδων (Hood and Zotolla, 1995). Πρόσφατα ευρήματα αποδεικνύουν ότι η συμπαγής και πολύπλοκη δομή των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών ενός βιοϋμενίου προσδίδει αυξημένη ανθεκτικότητα στα προσκολλημένα κύτταρα έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων στις απολυμαντικές ουσίες (Bridier et al., 2011 a, b).

Τα χημικά απολυμαντικά χαρακτηρίζονται από την μη επιλεκτική τους δράση έναντι των μικροοργανισμών. Τα χημικά απολυμαντικά δρουν γενικά σε πολλαπλούς στόχους καταστρέφοντας το εξωκυτταρικό πολυμερές και έπειτα το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων ή διάφορες λειτουργικές πρωτεΐνες. Πολλά χημικά απολυμαντικά είναι ακατάλληλα και μη αποδεκτά για τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων λόγω της τοξικής τους δράσης (Viazis et al., 2011). Επιπρόσθετα, τα χημικά απολυμαντικά με την δράση τους αλλάζουν την υδροφοβικότητα του κυτταρικού τοιχώματος, η κυτταρική μεμβράνη διαταράσσεται προκαλώντας διαρροή

των ενδοκυτταρικών συστατικών, επίσης διαταράσσουν την παραγωγή ATP, αλληλεπιδρούν με ένζυμα και αναστέλλουν τη σύνθεση γενετικού υλικού (Maillard, 2002). Για παράδειγμα το χλωριούχο βενζαλκόνιο (BAC) στοχεύει στην κυτταρική λύση, είναι ένα χημικό απολυμαντικό που ανήκει στην κατηγορία των ενώσεων τεταρτογενούς αμμωνίου (Giaouris et al., 2014 b). Το πάχος, η κυτταρική πυκνότητα, το είδος του βακτηρίου αλλά και οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων βακτηρίων σε περιπτώσεις μεικτού βιοϋμενίου επηρεάζουν την ανθεκτικότητα ενός βιοϋμενίου (Burmølle et al., 2006, Leriche et al., 2003). Αποτελέσματα από διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί δείχνουν ότι τα κύτταρα ενός βιοϋμενίου μπορεί να είναι έως και 1000 φορές πιο ανθεκτικά από στα απολυμαντικά έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων (Belessi et al. 2011, Bridier et al., 2011a, Corterson et al., 1999).

1.8 *Listeria monocytogenes*

1.8.1 Χαρακτηριστικά *Listeria monocytogenes*

Πρώτη καταγραφή του *Listeria monocytogenes* έγινε από τους Murray et al. το 1926 που ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes* λόγω της μονοκυττάρωσης που συναντήθηκε σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια σε εργαστήριο. Αργότερα το 1927 ο Pirie έδωσε την ονομασία *Listerella hepatolytica* και έπειτα το 1940 το τελικό της όνομα (Seeliger & Jones, 1986). Άλλη καταγραφή έγινε το 1929 από τον Gill σε πρόβατα και η πρώτη καταγραφή σε άνθρωπο έγινε στα τέλη του Α΄ Παγκοσμίου Πολέμου (McLauchlin, 1997a).

Το *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram + βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, μη σποριογόνο και με ραβδοειδή μορφή (βάκιλος). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes* είναι 30-37°C αλλά μπορεί να αναπτυχθεί και σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες 4-10°C (Lorber, 2007). Γενικότερα το θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes* είναι από -4 έως 45°C

(Hanna & Wang, 2007). Επίσης, παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε τιμή pH 7.0 αλλά μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH 4.4 έως 9.4 (Parish & Higgins, 1989). Όσον αφορά την ενεργότητα νερού (a_w) έχει βέλτιστη ανάπτυξη στο 0,97 και γενικά μπορεί να αναπτυχθεί σε τιμές από 0.93 έως 0.99 αλλά μπορεί να επιβιώσει και σε χαμηλότερες τιμές έως 0.83 καθώς επίσης αντέχει σε υψηλές οσμωτικές συνθήκες (10-11% NaCl) (Vogel et al. 2010).



Εικόνα 1 : Φωτογραφία του *Listeria monocytogenes* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). (http://textbookofbacteriology.net/Listeria_2.html)

1.8.2 Πρόκληση ασθενειών

Το *Listeria monocytogenes* είναι ένας μικροοργανισμός που μολύνει συχνά τον ανθρώπινο πληθυσμό και καθίσταται πολύ επικίνδυνη σε ορισμένες ομάδες-κατηγορίες ανθρώπων όπως είναι οι ηλικιωμένοι, τα νεογέννητα, οι εγκυμονούσες και οι ανοσοκατασταλμένοι στους οποίους μπορεί να προκληθούν σοβαρά προβλήματα υγείας όπως μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και είναι θανάσιμα. Όταν ένα τρόφιμο έχει επιμολυνθεί από *Listeria monocytogenes* και καταναλωθεί από ανθρώπους τότε προκαλεί λιστερίωση και έχει τα συμπτώματα του πυρετού και της γαστρεντερίτιδας (Low and Donachie 1997, Churchill et al. 2006).

Η λιστερίωση προκαλείται από το *Listeria monocytogenes*, όπου είναι μία τροφιογενή λοίμωξη με ποσοστό θνησιμότητας να ανέρχεται στο 19% (Scallan

et al. 2011). Μεταξύ άλλων τροφιμογενών λοιμώξεων η λιστερίωση έχει το μεγαλύτερο ποσοστό νοσηλείας περίπου 99% (Buchanan et al. 2017). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), το *Listeria monocytogenes* μολύνει τα όργανα του ανθρώπου και προκαλεί τις ίδιες ασθένειες που προαναφέρθηκαν (EFSA 2016). Επίσης η EFSA αναφέρει πως στα υγιή άτομα δεν έχει κάποια σοβαρή συνέπεια σε αντίθεση με αυτούς που έχουν χαμηλό ανοσοποιητικό σύστημα (ηλικιωμένους, έμβρυα και έγγειους). Από το 2008 έως το 2014 έχουν αυξηθεί σημαντικά τα κρούσματα στην Ευρώπη, ενώ το 2022 παρατηρήθηκαν οι περισσότεροι θάνατοι των τελευταίων 10 ετών, σε ανθρώπους, που οφείλονταν σε τροφιμογενή λοίμωξη από *Listeria monocytogenes* (EFSA 2022). Η Ευρωπαϊκή Ένωση γνωστοποίησε ότι το 2013 το ποσοστό των κρουσμάτων ήταν 0,44 υποθέσεις ανά 100.000 ανθρώπους το οποίο δηλώνει ανάπτυξη 8,6% σε σχέση με το 2012.

Εκτός από την κατάποση τροφίμων η λιστερίωση μπορεί να μεταδοθεί και κατακόρυφα (από την μητέρα στο παιδί), από την επαφή των ζώων με τον άνθρωπο (ζωονόσος), αλλά ακόμη και από τα νοσοκομεία (Low and Donachie 1997, Churchill et al. 2006, Lorber, 2007).

1.8.3 *Listeria monocytogenes* στη βιομηχανία

Το *Listeria monocytogenes* βρίσκεται παντού στο περιβάλλον (McLauchlin et al. 2009). Η επιμόλυνση των περιβαλλόντων επεξεργασίας τροφίμων είναι αναπόφευκτη εκτός και αν ληφθούν αυστηρά μέτρα για την πρόληψη της επιμόλυνσης. Όπως ήδη προαναφέρθηκε το *Listeria monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει σε εχθρικά προς αυτήν περιβάλλοντα για μεγάλα χρονικά διαστήματα όπως είναι οι μονάδες επεξεργασίας τροφίμων λόγω της ικανότητας της να αντέχει σε διάφορες καταπονήσεις για παράδειγμα pH, απολυμαντικές ουσίες,

θερμοκρασία, aw. (Moorhead et al. 2004, Zhang et al. 2011). Λόγω αυτής της ικανότητας μπορεί να δημιουργήσει βιοϋμένια (Latorre et al. 2010, Cruz et al. 2011).

Σύμφωνα με τους Pérez-Rodríguez et al. (2018) αν σε ένα χώρο επεξεργασίας τροφίμων υπάρχει επιμόλυνση, το πιο πιθανόν είναι να έχει γίνει από *Listeria monocytogenes*. Η επιμόλυνση των χώρων επεξεργασίας τροφίμων από *Listeria monocytogenes* αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την βιομηχανία τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα μεγάλο πρόβλημα αποτελεί στην βιομηχανία των τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση (Ready to Eat, RTE) καθώς δεν υπάρχει κάποιο μέτρο ελέγχου όπως η θέρμανση ή κάποιος αντιμικροβιακός παράγοντας ανάμεσα στα στάδια παραγωγής και την κατανάλωση. Παρόλα αυτά μπορούν να ληφθούν μέτρα για την μείωση της επιμόλυνσης λαμβάνοντας κατάλληλα μέτρα για την ορθή υγιεινή και να μειωθεί η διασταυρούμενη επιμόλυνση των προϊόντων. Μεγάλη σημασία έχει η εκπαίδευση των καταναλωτών σχετικά με τα βασικά μέτρα ορθής υγιεινής πρακτικής (Rebagliati et al., 2009). Ειδικότερα, υψίστης σημασίας θεωρείται η επαρκής θερμική επεξεργασία των νωπών προϊόντων (κρέας, ψάρι, πουλερικά). Θανάτωση του *Listeria monocytogenes* μπορεί να προκληθεί με το μαγείρεμα των τροφίμων σε κατάλληλες θερμοκρασίες. Αναφορικά με τα τρόφιμα που καταναλώνονται χωρίς θερμική επεξεργασία, η κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος ή προϊόντων από απαστερίωτο γάλα πρέπει να αποφεύγεται (Lundén et al., 2004). Επιπρόσθετα, εξαιρετικά σημαντική είναι η πρόληψη της διασταυρούμενης μόλυνσης των τροφίμων. Ειδικότερα, πρέπει να αποφεύγεται η επαφή των νωπών κρεάτων με τα μαγειρεμένα και τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα. Ταυτόχρονα, πριν τον χειρισμό των τροφίμων πρέπει να γίνεται σχολαστικός καθαρισμός του εξοπλισμού καθώς και του

προσωπικού. Επιπλέον η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes* μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της λιστερίωσης έως και 37% (Hazards et al. 2008).

Το πολυστυρένιο (PS) είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές που χαρακτηρίζεται από υψηλή ημιδιαφάνεια, ανθεκτικότητα και μπορεί να βαφτεί εύκολα. Το πολυστυρένιο ως στερεό υλικό χρησιμοποιείται για την παραγωγή CD, παιχνιδιών, οδοντόβουρτσων κ.λπ. Το πολυστυρένιο χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή του φελιζόλ, ένα υλικό που χαρακτηρίζεται από περιορισμένη ελαστικότητα. Παράγεται με ταχεία θέρμανση του πολυστυρενίου. Το φελιζόλ χρησιμοποιείται ευρέως στο παραγωγή δοχείων τροφίμων, όπως δίσκοι, πιάτα, κύπελλα. Επίσης χρησιμοποιείται για την αποθήκευση και τη μεταφορά τροφίμων, για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων συσκευασίας και για την παραγωγή παιχνιδιών, συνδετήρων (Wünsch, 2000, Johannaber and Michaeli, 2004, Domininghaus et al., 2005).

1.8.4 Νομοθεσία του *Listeria monocytogenes*

Η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 θέτει τις προϋποθέσεις-κριτήρια που πρέπει να τηρούνται στα τρόφιμα για το *L. monocytogenes*. Στην Ε.Ε. απαιτείται η απουσία του *Listeria monocytogenes* από τα τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και ειδικούς σκοπούς (ιατρικούς) και επιτρέπεται σε διαφορετικά επίπεδα ανάλογα με την ικανότητα του τροφίμου να υποστηρίξει την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου. Όσον αφορά τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Ready To Eat, RTE) το επιτρεπτό-αποδεκτό όριο του πληθυσμού πρέπει να είναι <100 cfu/g για όλη την διάρκεια ζωής του προϊόντος. Εάν σε κάποιο τρόφιμο δεν έχει προσδιοριστεί η ικανότητα ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes* τότε προβλέπεται να εφαρμοστεί απουσία του *Listeria*

monocytogenes monocytogenes. Παρόμοιες νομοθεσίες υπάρχουν στον Καναδά (Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods 2011), την Αυστραλία και την Νέα Ζηλανδία (Microbiological limits for food (Standard 1.6.1), 2014). Όσον αφορά την νομοθεσία στις Η.Π.Α. είναι πιο αυστηρή από αυτήν της Ε.Ε.. Στις Η.Π.Α. η νομοθεσία προβλέπει απουσία του *Listeria monocytogenes* σε δείγμα αλλά και στο περιβάλλον επεξεργασίας απαιτείται το ίδιο (USDA 2014).

1.9 Σκοπός

Με βάση τα παραπάνω η παρουσία του *Listeria monocytogenes* και η ανάπτυξη βιοϋμενίων στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί ένα από τα κύρια ζητήματα που απασχολούν τον κλάδο, καθώς τίθεται μεγάλο ζήτημα ασφάλειας των παραγόμενων τροφίμων και συνεπώς κίνδυνος για την δημόσια υγεία. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής διατριβής ήταν η προσπάθεια προσομοίωσης συνθηκών παρόμοιων με αυτών μιας μονάδας επεξεργασίας τροφίμων, όπου μικροοργανισμοί παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον διότι τα κύτταρα τους μπορεί να βρεθούν στις επιφάνειες της βιομηχανίας όπως είναι κύτταρα του *Listeria monocytogenes* και των *Pseudomonas*, καθώς και άλλων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και σχηματίζουν βιοϋμένια σε επιφάνειες πολυστυρενίου με θρεπτικό υπόστρωμα ιχθύος σε θερμοκρασία που επικρατεί στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων. Για την επίτευξη του σκοπού πραγματοποιήθηκε η *in vitro* ανάπτυξη και παραγωγή βιοϋμενίου διαφόρων στελεχών του είδους *Listeria monocytogenes* σε μονοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργεια με αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς σε επιφάνειες από πολυστυρένιο. Έτσι δημιουργήθηκαν συγκεκριμένες συνθήκες οι οποίες προσομοιάζουν εκείνες που επικρατούν σε μία μονάδα επεξεργασίας τροφίμων και μελετήθηκε η συμπεριφορά και η πιθανή ανάπτυξη βιοϋμενίων διαφόρων στελεχών του *Listeria monocytogenes* σε επιφάνειες πολυστυρενίου σε θερμοκρασία 8°C.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Στη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα. Στο πρώτο πείραμα εξετάστηκε ο πιθανός σχηματισμός βιοϋμενίων από διάφορα στελέχη *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas*, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, σε αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος (μεταχείριση 1: *Listeria monocytogenes*, μεταχείριση 2: *Pseudomonas*., μεταχείριση 3: *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas*. Κατά το δεύτερο πείραμα μελετήθηκε ο πιθανός σχηματισμός βιοϋμενίων από διάφορα στελέχη *Listeria monocytogenes* σε συνδυασμό με την φυσική μικροχλωρίδα μη αποστειρωμένου ζωμού ιχθύος.

2.1 Προετοιμασία Ζωμού Ιχθύος (Fish Juice, F.J.)

Έγινε παραλαβή ιχθύων τσιπούρας (*Sparus aurata*) από ιχθυοπωλείο της πόλης του Βόλου. Οι ιχθύες τσιπούρας τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο με πάγο και οδηγήθηκαν στο εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας εντός μίας ώρας από την παραλαβή τους. Μετά τον απαραίτητο καθαρισμό τα δείγματα φιλετοποιήθηκαν. Λήφθηκαν ασηπτικά 250 g δείγματος σε ειδική αποστειρωμένη σακούλα stomacher μαζί με 250 ml MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.1% w/v peptone, 0.85% w/v NaCl) και ομογενοποιήθηκαν για 4 λεπτά χρησιμοποιώντας τη συσκευή Stomacher (Bug Mixer, Interscience, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο) για την παραλαβή καθαρού ζωμού ιχθύος. Για τις ανάγκες του πρώτου πειράματος πραγματοποιήθηκε βρασμός στους 120°C για 30 λεπτά.

2.2 Προετοιμασία Καλλιιεργειών

Αρχικά για τη διεξαγωγή του πειράματος ελήφθησαν έξι στελέχη που ανήκουν στο είδος *Listeria monocytogenes* με κωδικές ονομασίες L128, L129, L206, L207,

L131, L133 από την Τράπεζα Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και δύο στελέχη *Pseudomonas* (*Pseudomonas gessardii* και *Pseudomonas fragi*) από την Τράπεζα Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Εργαστήριο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων (ETEXNAT) του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Όλα τα στελέχη ήταν αποθηκευμένα στους -80°C.

Στην συνέχεια για την προετοιμασία των στελεχών πραγματοποιήθηκε η αναζωογόνησή τους και ελέγχθηκε εάν είναι καθαρές οι αποικίες. Μετέπειτα, έγινε μεταφορά βακτηριακών αποικιών με χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου σε σωληνάκια που περιείχαν Tryptone Soy Broth (TSB) και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37 και 25°C για τα στελέχη *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas*. (*Pseudomonas gessardii* και *Pseudomonas fragi*) αντίστοιχα. Έπειτα οι αναζωογονημένες καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 1800 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι αρχικοί πληθυσμοί ήταν 10^6 cfu/ml. Στους συγκεκριμένους πειραματικούς σχεδιασμούς χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες 24 ωρών οι οποίες εμβολιάστηκαν είτε στον αποστειρωμένο είτε στον μη αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος σε μόνο ή μεικτή καλλιέργεια όπως περιγράφεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Εμβολιασμός καλλιιεργειών πληθυσμού 10^6 cfu/ml σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.

Υπόστρωμα	Καλλιέργεια Μ/Ο	Τελική συγκέντρωση (cfu/ml)
Αποστειρωμένος ζωμός ιχθύος	<i>Listeria monocytogenes</i>	10^6
	<i>Pseudomonas</i>	10^6
	Mix (<i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Pseudomonas</i>)	10^6
Μη αποστειρωμένος ζωμός ιχθύος	<i>Listeria monocytogenes</i>	10^6

2.3 Πειραματικός Σχεδιασμός

Οι παραγόμενοι ζωμοί ιχθύων μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε αποστειρωμένη μικροπλακέτα 96 βοθρίων (micro test plate) της εταιρίας Sarstedt (Nümbrecht, Germany) από πολυστυρένιο. Κατά τη διάρκεια του πρώτου πειράματος, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των φρέσκων καλλιιεργειών στον αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του εμβολιασμού τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους $7,9^{\circ}\text{C}$. Οι μικροβιολογικές μετρήσεις πραγματοποιούνταν ανά τακτικά χρονικά διαστήματα και συνολικά για διάστημα 10 ημερών (3, 48, 96, 144, 192, 240 ώρες). Αρχικά τοποθετήθηκε ο ζωμός ιχθύος στα βοθρία της μικροπλακέτας και εμβολιάστηκαν με τις αναζωογονημένες καλλιέργειες. Έπειτα στις χρονικές στιγμές που αναφέρθηκαν, πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα των βοθρίων με σαλίνη (NaCl 0.85% w/v) και απόξεσή τους με αποστειρωμένο ρύγχος (tip). Για τις ανάγκες της κάθε ανάλυσης

πραγματοποιούνταν απομάκρυνση του ζωμού ιχθύος από τα βοθρία (3, 48, 96, 144, 192, 240 ώρες) για να διεκπεραιωθούν οι μικροβιολογικές αναλύσεις σε τριβλία (Petri). Μετά τη διεκπεραίωση της μικροβιολογικής ανάλυσης που πραγματοποιούνταν σύμφωνα με τα προαναφερθέντα χρονικά διαστήματα γινόταν επιπροσθέτως και ανανέωση του ζωμού ιχθύος (Maniki et al. 2023).

Στο δεύτερο πειραματικό μέρος που ακολούθησε στα βοθρία τοποθετήθηκε ο ζωμός ιχθύος χωρίς κάποιου είδους επεξεργασία και με εμβολιασμό της καλλιέργειας των έξι στελεχών *Listeria monocytogenes*. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο ζωμός ιχθύος δεν αποστειρώθηκε διότι σκοπός ήταν η παρατήρηση της πιθανής ανάπτυξης του βιοϋμενίου του *Listeria monocytogenes* όταν συνυπάρχει με την φυσική μικροχλωρίδα της τσιπούρας.



Εικόνα 1.3:Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση του πειράματος

2.3 Θρεπτικά Υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν της εταιρείας Neogen Corporation. Το Tryptone Soy Agar (TSA) είναι θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, με χρόνο επώασης 48-72 ώρες στους 25 °C. Το Cetrime Fucidin Cephaloridine (CFC)

Agar, αποτελεί ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για τα *Pseudomonas sp.* επωάζεται για 48 ώρες στους 25°C. Το Iron Agar (IA) κατά Lyngby είναι ένα θρεπτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων, επωάζεται στους 25°C για 48 ώρες και καταμετρούνται μόνο οι μαύρες αποικίες. Το Violet Red Blue Glucose Agar (VRBGA), είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των εντερο-βακτηριδιοειδών, επωάζεται στους 37°C για 24 ώρες, στο οποίο καταμετρούνται οι μωβ αποικίες. Το Mann Rogasa Shapre Agar (MRS), είναι ένα θρεπτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria, LAB), επωάζεται στους 25°C για 72 ώρες. Τέλος το Oxford είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes*, επωάζεται στους 37°C για 24-48 ώρες και καταμετρούνται μόνο οι μαύρες αποικίες που δημιουργούν μια χαρακτηριστική μαύρη άλο γύρω από την αποικία.

Πίνακας 1.2: Θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Θρεπτικά υλικά	Μικροοργανισμός	Χρόνος (σε ώρες)	Θερμοκρασία (σε °C)
TSA	Ολική μεσόφιλη χλωρίδα (O.M.X.)	48-72	25°C
CFC	<i>Pseudomonas sp.</i>	48	25°C
IA	Υδροθειοπαραγωγά βακτήρια	48	25°C
VRBGA	Εντερο-βακτηρίδια	24	37°C
MRS	οξυγαλακτικά βακτήρια	72	25°C
OXFORD	<i>Listeria monocytogenes</i>	24-48	37°C

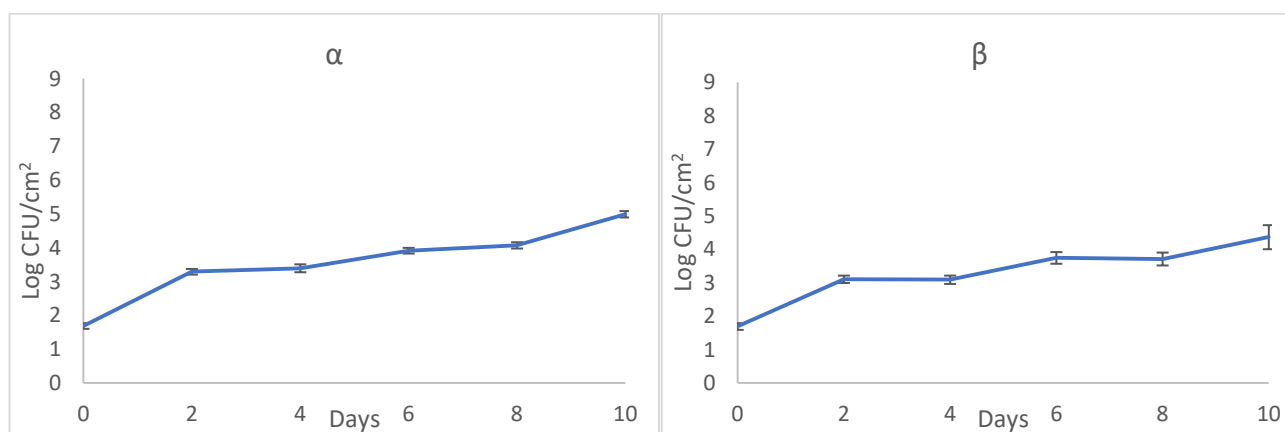
3. Αποτελέσματα

3.1 Παρατήρηση ανάπτυξης μικροβιακού πληθυσμού βιοϋμενίου σε αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος.

3.1.1 Παρατήρηση ανάπτυξης βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* σε μονοκαλλιέργεια

Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται οι γραφικές παραστάσεις μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου των στελεχών *Listeria monocytogenes*.

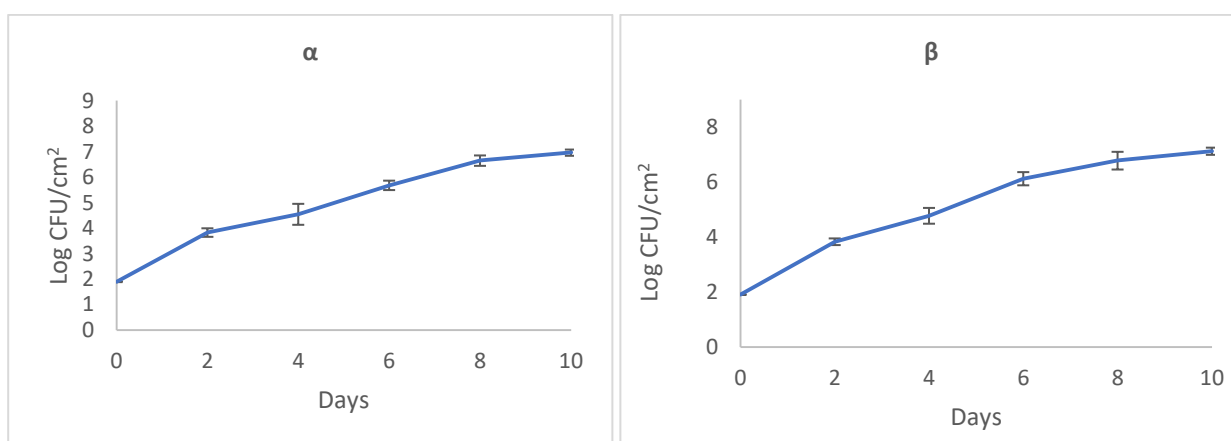
Αρχικά, αμέσως μετά την προσκόλληση, εντός 3 ωρών από την επώαση της μικροπλακέτας παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός του *Listeria monocytogenes* και στα δύο θρεπτικά υποστρώματα (TSA και OXFORD) ήταν $1,7 \log \text{cfu/cm}^2$. Την 2^η ημέρα οι πληθυσμοί φτάσανε στα επίπεδα των $3,1 \log \text{cfu/cm}^2$. Έπειτα τις επόμενες ημέρες και ως την 8^η ημέρα οι πληθυσμοί παρουσίασαν ανάπτυξη φτάνοντας περίπου στα επίπεδα των $4 \log \text{cfu/cm}^2$. Οι πληθυσμοί των βιοϋμενίων έφτασαν στα μέγιστα επίπεδα των $5 \log \text{cfu/cm}^2$ την 10^η ημέρα.



Σχήμα 1: Γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* απαριθμούμενο σε TSA (α) και OXFORD (β) που αναπτύχθηκε σε επιφάνειες από πολυστυρένιο σε αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 8°C.

3.1.2 Παρατήρηση ανάπτυξης βιοϋμενίου *Pseudomonas* σε μονοκαλλιέργεια

Στο Σχήμα 2 φαίνονται οι γραφικές παραστάσεις μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου των 2 στελεχών *Pseudomonas* σε μικτή καλλιέργεια απαριθμούμενοι σε θρεπτικά υλικά TSA και CFC. Έπειτα από 3 ώρες επώασης ο πληθυσμός του βιοϋμενίου και στα δύο θρεπτικά υλικά ήταν στα επίπεδα των 1.9 log cfu/cm². Κατά την 2^η ημέρα οι πληθυσμοί βρέθηκαν περί των 3,8 log cfu/cm² ενώ τις επόμενες ημέρες οι πληθυσμοί παρουσίασαν ανάπτυξη περί του 1 log cfu/cm² ανά ημέρα φτάνοντας 6,7 log cfu/cm² την 8^η ημέρα. Ενώ έφτασε στα μέγιστα επίπεδα την τελευταία ημέρα (10^η ημέρα) περί των 7 log cfu/cm².



Σχήμα 2: Γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου *Pseudomonas* απαριθμούμενο σε TSA (α) και CFC (β) που αναπτύχθηκε σε επιφάνειες από πολυστυρένιο σε αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 8°C.

3.1.3 Παρατήρηση ανάπτυξης βιοϋμενίου συγκαλλιέργειας *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas*

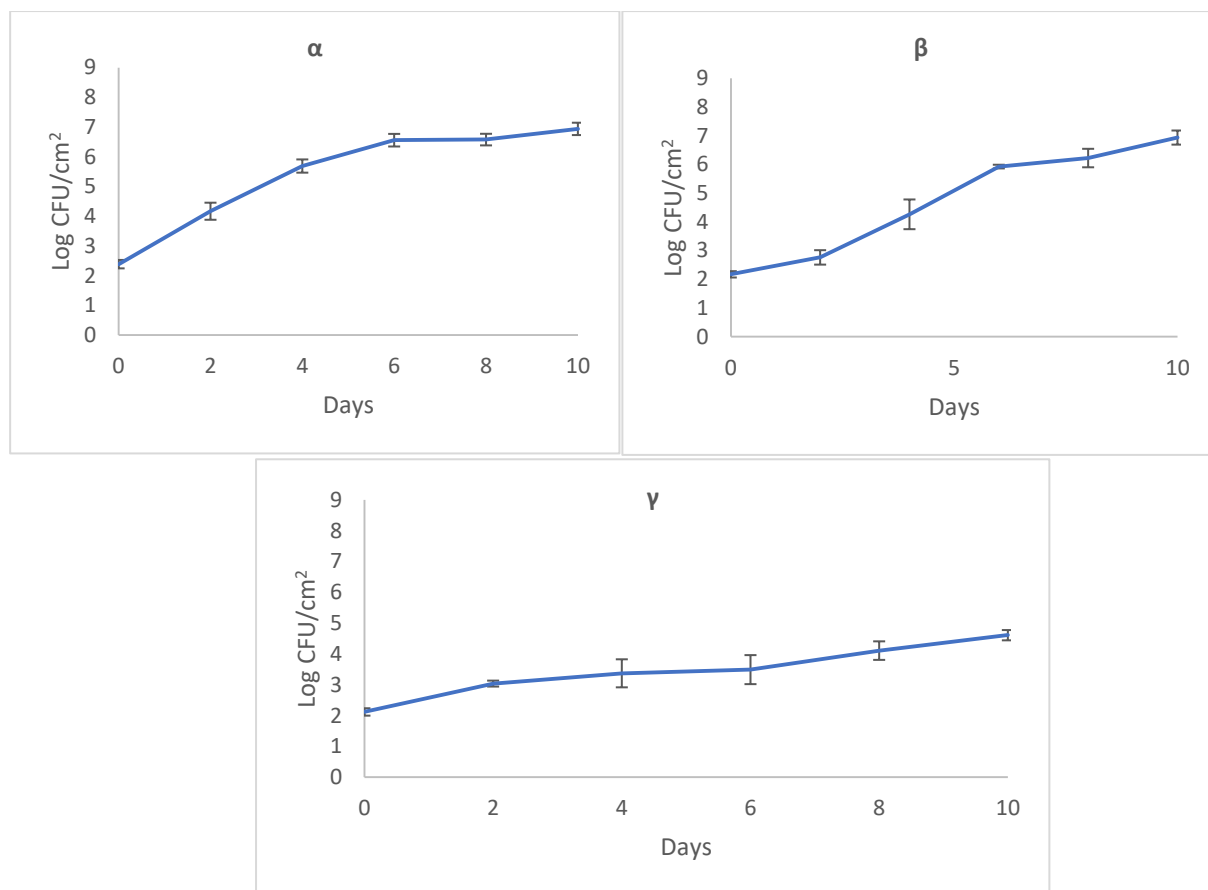
Η παρακολούθηση της ανάπτυξης του πληθυσμού βιοϋμενίου των έξι στελεχών *Listeria monocytogenes* και δύο στελεχών *Pseudomonas* σε αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος διεκπεραιώθηκε σε χρονικό διάστημα 10 ημερών στους 8°C. Στο Σχήμα

3 απεικονίζονται οι γραφικές παραστάσεις μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίων της μικτής καλλιέργειας.

Εντός 3 ωρών από την επώαση της μικροπλακέτας παρατηρήθηκε ότι ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός του βιοϋμενίου (σε συγκαλλιέργεια) βρέθηκε περί των $2,4 \log \text{ cfu/cm}^2$ και αυξήθηκε σταδιακά μέχρι το μέγιστο των $6,5 \log \text{ cfu/cm}^2$ την 6^η ημέρα και σχεδόν παρέμεινε σε αυτό τον πληθυσμό μέχρι το τέλος των μετρήσεων την 10^η ημέρα όπου παρατηρήθηκε μια ελαφρά ανάπτυξη στους $7 \log \text{ cfu/cm}^2$.

Ο πληθυσμός των *Pseudomonas* στην συγκαλλιέργεια αρχικά μετά το πέρας των 3 ωρών απαριθμήθηκε στα $2,2 \log \text{ cfu/cm}^2$. Έπειτα, σταδιακά έφτασε τα επίπεδα των $6 \log \text{ cfu/cm}^2$ κατά την 6^η ημέρα όπου παρέμεινε σε αυτά και την 8^η ημέρα. Τέλος παρουσίασε την μέγιστη τιμή κατά την 10^η ημέρα όπου έφτασε τα $7 \log \text{ cfu/cm}^2$.

Ο πληθυσμός του *Listeria monocytogenes* στην συγκαλλιέργεια αρχικά μετά το πέρας των 3 ωρών απαριθμήθηκε στα $2,1 \log \text{ cfu/cm}^2$. Έπειτα, σταδιακά έφτασε τα επίπεδα των $3 \log \text{ cfu/cm}^2$ κατά την 2^η ημέρα όπου παρέμεινε σε αυτά και την 6^η ημέρα. Τέλος παρουσίασε την μέγιστη τιμή κατά την 10^η ημέρα όπου έφτασε τα $4,5 \log \text{ cfu/cm}^2$.



Σχήμα 3: Γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου της συγκαλλιέργειας *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* που αναπτύχθηκε σε επιφάνειες από πολυστυρένιο με αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 8°C. Ολικός μικροβιακός πληθυσμός σε TSA (α), πληθυσμός *Pseudomonas* σε CFC (β) και πληθυσμός *Listeria* σε OXFORD (γ)

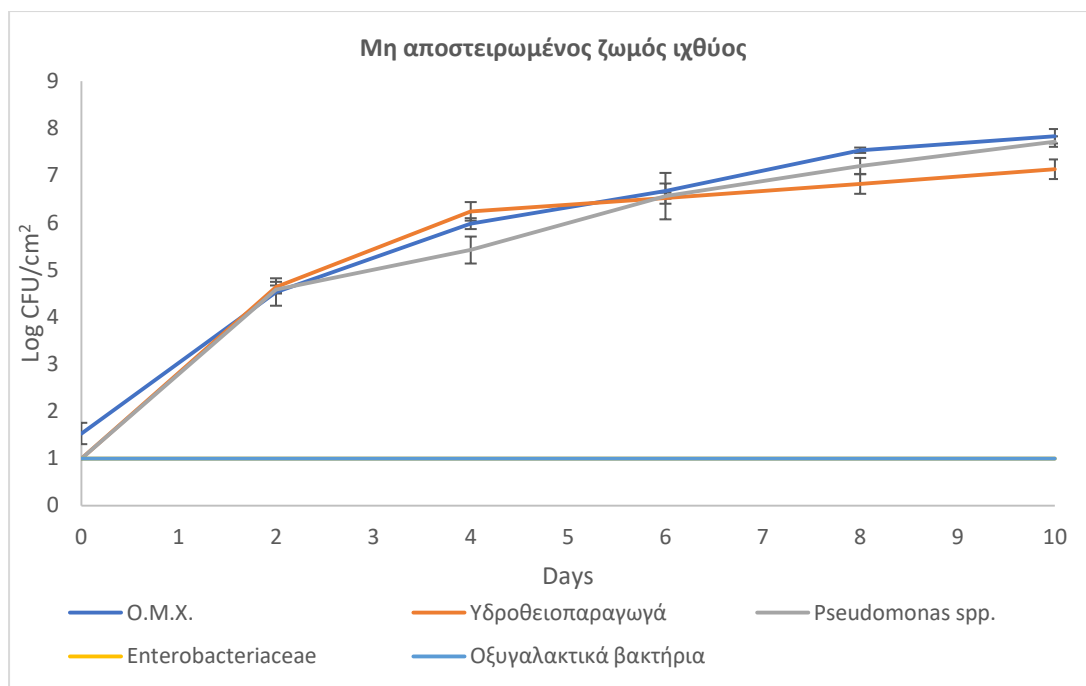
Από το Σχήμα 3 β και γ βλέπουμε ότι εντός 3 ωρών από την επώαση της μικροπλακέτας και οι δύο μικτοί πληθυσμοί των *Listeria* και *Pseudomonas* σε συγκαλλιέργεια ήταν της τάξεως των 2 log cfu/cm². Τα *Pseudomonas* αναπτύχθηκαν ταχύτερα από το *Listeria* φθάνοντας τα 6 log cfu/cm² την 6^η ημέρα επώασης με τελικό πληθυσμό την 10^η ημέρα τα 7 log cfu/cm². Αντιθέτως το *Listeria* αναπτύχθηκε με αργότερο ρυθμό και δεν έφθασε παραπάνω από 4.5 log cfu/cm² καθ' όλη την

διάρκεια του πειράματος. Παρόλο που ο αρχικός πληθυσμός των δύο μικροοργανισμών κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα, ο τελικός πληθυσμός των *Pseudomonas* παρουσίασε μία διαφορά της τάξης των 2 με 2.5 log cfu/cm² έναντι του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes*.

3.2 Παρατήρηση ανάπτυξης πληθυσμού βιοϋμενίου σε μη αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος εμβολιασμένου ή όχι με *Listeria monocytogenes*

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης του πληθυσμού βιοϋμενίου του ολικού μικροβιακού πληθυσμού σε ζωμό ιχθύος τσιπούρας διεκπεραιώθηκε σε χρονικό διάστημα 10 ημερών. Η παρακολούθηση πραγματοποιήθηκε στους 7,9°C, σε επιφάνειες από πολυστυρένιο. Στο σχήμα 4 απεικονίζεται η γραφική παράσταση ανάπτυξης πληθυσμού του βιοϋμενίου της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των υδροθειουχοπαραγωγών βακτηρίων, των *Pseudomonas* spp., των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Αρχικά μετά το πέρας των τριών πρώτων ωρών που πραγματοποιήθηκε η προσκόλληση των κυττάρων ο αρχικός πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX.) βρέθηκε περίπου 1,5 log cfu/cm². Κατά την δεύτερη ημέρα ο συνολικός πληθυσμός παρουσίασε μεγάλη ανάπτυξη φτάνοντας τους 4,5 log cfu/cm². Στις επόμενες ημέρες παρατηρήθηκε μία σχεδόν εκθετική ανάπτυξη κατά την περίοδο της επώασης αυξάνοντας περίπου κατά 1 log cfu/cm² φτάνοντας στα επίπεδα των 7,5 log cfu/cm² την 8^η ημέρα. Οι πληθυσμοί των βιοϋμενίων έφτασαν στα μέγιστα επίπεδα των 7,8 log cfu/cm² την 10^η ημέρα.



Σχήμα 4: Γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου της φυσικής μικροχλωρίδας τσιπούρας που αναπτύχθηκε σε επιφάνειες πολυστυρενίου σε ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 8°C

Κατά την πρώτη μέτρηση (πέρας τριών πρώτων ωρών) ο πληθυσμός των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης. Έπειτα την 2^η ημέρα ο πληθυσμός των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων έφτασε στα επίπεδα των 4,6 log cfu/cm². Την 4^η ημέρα ο πληθυσμός έφτασε στα επίπεδα των 6,2 log cfu/cm² μένοντας στα ίδια επίπεδα μέχρι την 8^η ημέρα παρουσιάζοντας μικρή ανάπτυξη τις ενδιάμεσες ημέρες. Η μέγιστη τιμή του πληθυσμού των κυττάρων του βιοϋμενίου των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων παρουσιάστηκε την 10^η ημέρα φτάνοντας στα επίπεδα των 7 log cfu/cm².

Αρχικά μετά το πέρας των τριών πρώτων ωρών ο πληθυσμός των *Pseudomonas spp.* βρέθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης. Την δεύτερη ημέρα έφτασε στα επίπεδα των 4,5 log cfu/cm² και κατά τις επόμενες ημέρες είχε μία σχεδόν εκθετική ανάπτυξη αυξάνοντας σχεδόν κατά 1 log cfu/cm² ανά ημέρα φτάνοντας τους

7,2 log cfu/cm² κατά την 8^η ημέρα. Ο μέγιστος πληθυσμός παρατηρήθηκε την 10^η ημέρα όπου βρέθηκε να είναι στα επίπεδα των 7,7 log cfu/cm².

Στην περίπτωση των Εντεροβακτηριοειδών (Enterobacteriaceae) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος οι πληθυσμοί τους βρέθηκαν κάτω του ορίου ελέγχου.

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης του πληθυσμού βιοϋμενίου του ολικού μικροβιακού πληθυσμού ζωμού ιχθύος τσιπούρας εμβολιασμένο με μικτή καλλιέργεια 6 στελεχών *Listeria monocytogenes* διεκπεραιώθηκε σε χρονικό διάστημα 10 ημερών. Η παρακολούθηση πραγματοποιήθηκε στους 8°C, σε επιφάνειες από πολυστυρένιο. Στο σχήμα 5 απεικονίζεται η γραφική παράσταση ανάπτυξης πληθυσμού του βιοϋμενίου της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των υδροθειουχοπαραγωγών βακτηρίων, των *Pseudomonas spp.*, των Enterobacteriaceae και των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσία του *Listeria monocytogenes*.

Όσον αφορά τον πληθυσμό των κυττάρων του βιοϋμενίου των 6 στελεχών του *Listeria monocytogenes* σε συνδυασμό με την φυσική μικροχλωρίδα τσιπούρας αρχικά μετά την αρχική προσκόλληση βρέθηκε περί των 2,1 log cfu/cm². Στην συνέχεια παρουσιάστηκε παρόμοια ανάπτυξη στους πληθυσμούς των κυττάρων των βιοϋμενίων όπως και προηγουμένως με την ανάπτυξη του πληθυσμού του βιοϋμενίου της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Ο πληθυσμός του βιοϋμενίου έφτασε στα μέγιστα επίπεδα των 7 log cfu/cm² κατά την 8^η ημέρα. Ο μέγιστος πληθυσμός παρουσιάστηκε την 10^η ημέρα φτάνοντας τους 7,9 log cfu/cm².

Ο πληθυσμός των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων μετά το πέρας των τριών πρώτων ωρών βρέθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης. Ενώ την 2^η ημέρα ο πληθυσμός έφτασε στα επίπεδα των 4 log cfu/cm², ενώ κατά την τέταρτη ημέρα έφτασε στα

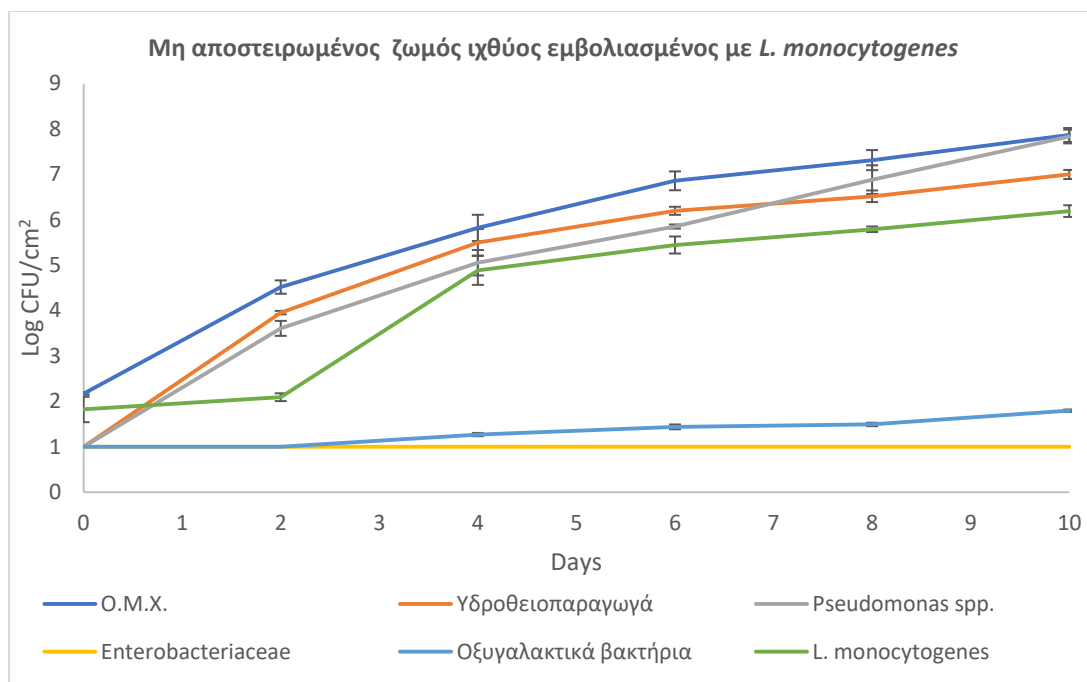
επίπεδα των $5,5 \log \text{ cfu/cm}^2$ και παρουσίασε ανάπτυξη περίπου $0,5 \log \text{ cfu/cm}^2$ ανά ημέρα έως και την 8^η ημέρα φτάνοντας τους $6,5 \log \text{ cfu/cm}^2$. Οι πληθυσμοί των βιοϋμενίων έφτασαν στα μέγιστα επίπεδα των $7 \log \text{ cfu/cm}^2$ κατά την 10^η ημέρα.

Αρχικά, μετά το πέρας τριών ωρών ο πληθυσμός των *Pseudomonas spp.* ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης. Κατά την 2^η ημέρα ο πληθυσμός έφτασε περί τα $3,67 \log \text{ cfu/cm}^2$. Στη συνέχεια ο πληθυσμός των κυττάρων του βιοϋμενίου έφτασε τους $7 \log \text{ cfu/cm}^2$ την 8^η ημέρα ενώ έφτασε στο μέγιστο του την 10^η ημέρα περί τα $7,8 \log \text{ cfu/cm}^2$.

Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρέμεινε κάτω του ορίου ανίχνευσης έως και την 2^η ημέρα. Κατά την 4^η ημέρα ο πληθυσμός έφτασε στα επίπεδα των $1,27 \log \text{ cfu/cm}^2$, μέχρι και την 8^η ημέρα υπήρξε μικρή ανάπτυξη του πληθυσμού, ενώ ο μέγιστος πληθυσμός παρουσιάστηκε την 10^η ημέρα φτάνοντας στα επίπεδα των $1,8 \log \text{ cfu/cm}^2$.

Έπειτα από τρεις ώρες επώασης ο πληθυσμός του βιοϋμενίου του *Listeria monocytogenes* βρέθηκε στα επίπεδα των $1,8 \log \text{ cfu/cm}^2$. Την 2^η ημέρα ο πληθυσμός έφτασε περίπου στα επίπεδα των $2 \log \text{ cfu/cm}^2$. Κατά την 4^η ημέρα ο πληθυσμός υπολογίστηκε περίπου στους $5 \log \text{ cfu/cm}^2$ όπου και παρέμεινε στα ίδια επίπεδα έως και την 8^η ημέρα παρουσιάζοντας μικρή ανάπτυξη. Ο μέγιστος πληθυσμός βρέθηκε στα επίπεδα των $6,2 \log \text{ cfu/cm}^2$ κατά την 10^η ημέρα.

Στην περίπτωση των Εντεροβακτηριοειδών (*Enterobacteriaceae*) και των καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος οι πληθυσμοί τους βρέθηκαν κάτω του ορίου ελέγχου.



Σχήμα 5: Γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου της φυσικής μικροχλωρίδας τσιπούρας εμβολιασμένο με μικτή καλλιέργεια 6 στελεχών *Listeria monocytogenes* που αναπτύχθηκε σε επιφάνειες πολυστυρενίου σε ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 8°C

4. Συζήτηση

Στην παρούσα έρευνα, στο πρώτο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε καθαρή καλλιέργεια 6 στελεχών *Listeria monocytogenes* καθώς και καθαρή καλλιέργεια 2 στελεχών *Pseudomonas*. σε αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος στους 8°C για διάστημα 10 ημερών σε μονο-καλλιέργειες και σε συγκαλλιέργεια. Το *Listeria monocytogenes* και τα *Pseudomonas* σε μονοκαλλιέργειες αναπτύχθηκαν πολύ καλά φτάνοντας τελικούς πληθυσμούς περί τα 4,5-5 log cfu/cm² και 7 log cfu/cm² αντίστοιχα μετά από 10 μέρες επώασης στους 8°C.

Είναι γνωστή η ικανότητα του *Listeria monocytogenes* να σχηματίζει βιοϋμένια σε διάφορες επιφάνειες. Αποτελεί τον κυριότερο λόγο επιμόλυνσης στη βιομηχανία τροφίμων (Carpentier & Cerf, 2011). Αρκετά είδη του γένους *Pseudomonas* μπορούν να συναντηθούν σε ποικίλα περιβάλλοντα, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, και δημιουργούν προβλήματα τα οποία σχετίζονται με το σχηματισμό βιοϋμενίου, καθώς αυτό συγκαταλέγεται στις ιδιαίτερες ικανότητές τους. Συγκεκριμένα το είδος *Pseudomonas fluorescens* εμφανίζεται πολύ συχνά στα τρόφιμα λόγω του μικρού χρόνου διπλασιασμού του, της αντοχής του σε διάφορα εύρη θερμοκρασιών και της ικανότητάς τους να σχηματίζουν βιοϋμένια (Simões et al. 2008). Πολλά προβλήματα σχετίζονται με τον *Pseudomonas* γεγονός που του προσάπτει την ιδιότητα να έχει μελετηθεί ευρέως, ειδικά ως προς την ικανότητα του να δημιουργεί βιοϋμένια (Benamara et al. 2011).

Ωστόσο σε συγκαλλιέργεια παρατηρήθηκε πως η ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* ήταν παρόμοια σε μόνο ή συγκαλλιέργεια με τα *Pseudomonas* φτάνοντας μέγιστο πληθυσμό τους 4,5 log cfu/cm² σε διάστημα 10 ημερών. Την 10^η ημέρα ο πληθυσμός των κυττάρων του βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* βρισκόταν περίπου 2,5 log cfu/cm² από τον πληθυσμό των *Pseudomonas*. Η μελέτη που

πραγματοποιήθηκε από τους Lebert et al. (2000) έδειξε ότι ο χρόνος δημιουργίας του *Listeria monocytogenes* ήταν ο ίδιος με την παρουσία ή όχι του *Pseudomonas* sp., το *Listeria monocytogenes* δεν επηρέασε την ανάπτυξη του *Pseudomonas* sp. ενώ η ανάπτυξή του βρισκόταν ένα επίπεδο πιο κάτω σε σχέση με τον *Pseudomonas* sp. και ο δεύτερος αποτέλεσε τον κυρίαρχο οργανισμό στην μικτή καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα της έρευνας των Lebert et al. (2000), φαίνεται να συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με αυτά της παρούσας εργασίας. Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Papaioannou et al. (2018) βρέθηκε ότι ο πληθυσμός του *Listeria monocytogenes* καθ' όλη τη διάρκεια βρισκόταν σε χαμηλότερα επίπεδα από τον πληθυσμό των *Pseudomonas*.

Στο δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μη αποστειρωμένος ζωμός ιχθύος, κατά την διάρκεια του ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας αρχικά βρέθηκε στον $1.5 \log \text{cfu/cm}^2$ και την 10^η ημέρα έφτασε περί τους $7.83 \log \text{cfu/cm}^2$ ενώ και οι άλλοι μικροοργανισμοί αυξηθήκαν στα επίπεδα των $7-7.7 \log \text{cfu/cm}^2$ τα υδροθιοπαραγωγά βακτήρια και τα *Pseudomonas* spp. αντίστοιχα σε αντίθεση με τα οξυγαλακτικά και τα εντεροβακτηριοειδή που καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος βρέθηκαν κάτω του ορίου ελέγχου. Όταν στον ίδιο ζωμό εμβολιάστηκαν στελέχη *Listeria monocytogenes* ο ολικός πληθυσμός σε TSA παρουσίασε παρόμοια ανάπτυξη με αυτήν της OMX. φτάνοντας τους $7.87 \log \text{cfu/cm}^2$ σε διάστημα 10 ημερών. Σύμφωνα με την έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Pang et al. (2019) σε ζωμό σολομού στους 4 °C σε κουπόνια από ανοξείδωτο χάλυβα, παρατηρήθηκε παρόμοια ανάπτυξη με αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω φτάνοντας σχεδόν στα επίπεδα των $6.5-7 \log \text{cfu/cm}^2$ κατά την έβδομη ημέρα. Όταν ο ίδιος ζωμός ιχθύος εμβολιάστηκε με *Listeria monocytogenes* ο πληθυσμός της απαριθμούμενος σε OXFORD Agar παρουσίασε παρόμοια ανάπτυξη φτάνοντας τους $6 \log \text{cfu/cm}^2$. Είναι εμφανές πως

όταν το *Listeria monocytogenes* εμβολιάστηκε στο ζωμό ιχθύος στον οποίο ζωμό υπήρχε η φυσική μικροχλωρίδα του ιχθύος ο πληθυσμός του *Listeria monocytogenes* ήταν υψηλότερος από κάθε άλλη παρατήρηση φτάνοντας κοντά στους 8 log cfu/cm², το οποίο ερμηνεύεται πως σε αυτή την πολύ-καλλιέργεια ευνοήθηκε η ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes*. Σε παρόμοιες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με μικτές καλλιέργειες του *Listeria monocytogenes* με άλλους μικροοργανισμούς, παρουσιάζονται ποικίλα αποτελέσματα σχετικά με τη συμπεριφορά των οργανισμών, ενώ κάποια από τα οποία συμφωνούν με την παρούσα έρευνα. Αναλυτικότερα, στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε από Carpentier and Chassaing (2004) φάνηκε ότι η παρουσία του *Staphylococcus capitis* σε ανοξείδωτο χάλυβα βοηθάει την αύξηση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes*. Επίσης σύμφωνα με τους Sasahara & Zotolla (1993) το *Pseudomonas fragi* σε ανοξείδωτο χάλυβα ευνοεί την ανάπτυξη του *Listeria monocytogenes* ήταν πολύ σημαντική για την ενίσχυση και τη δημιουργία του βιοϋμενίου του *Listeria monocytogenes*. Σύμφωνα με τους Hassan et al. (2004) το *Listeria monocytogenes* παρουσίασε αυξημένη προσκόλληση σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα στους 12°C σε TSB όταν είχε εγκατασταθεί σε αυτές ήδη το *Pseudomonas putida*. Επίσης σύμφωνα με τους Bremer et al. (2001) αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί όπως το *Flavobacterium sp.* ενισχύουν τον σχηματισμό βιοϋμενίου του *Listeria monocytogenes* σε επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα.

Ο πληθυσμός των κυττάρων του βιοϋμενίου των *Pseudomonas* αρχικά βρέθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης (1 log cfu/cm²), ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε ταχεία ανάπτυξη φτάνοντας σχεδόν στα επίπεδα των 8 log cfu/cm² κατά την 10^η ημέρα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην έρευνα των Papaioannou et al. (2018) όπου ο πληθυσμός των *Pseudomonas* έφτασε

τα επίπεδα των 6 log cfu/cm² σε διάστημα 10 ημερών σε κουπόνια από ανοξείδωτο χάλυβα στους 15 °C.

Ο πληθυσμός των κυττάρων του βιοϋμενίου των υδροθειοπαραγωγών βακτηρίων αρχικά βρέθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης (1 log cfu/cm²), ενώ τις επόμενες ημέρες παρατηρήθηκε ραγδαία ανάπτυξη φτάνοντας στα επίπεδα των 7 log cfu/cm² κατά την 10^η ημέρα. Σε παρόμοια έρευνα των Papaioannou et al. (2018) παρατηρήθηκαν αποτελέσματα παρόμοια με την παρούσα έρευνα όπου τα H₂S βακτήρια έφτασαν στα επίπεδα των 6 log cfu/cm² σε διάστημα 10 ημερών σε κουπόνια από ανοξείδωτο χάλυβα στους 15 °C.

Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε, ο πληθυσμός των κυττάρων των οξυγαλακτικών βακτηρίων έως και την 2^η ημέρα βρέθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης. Παρατηρήθηκε μικρή ανάπτυξη φτάνοντας στα μέγιστα επίπεδα των 1,8 log cfu/cm² κατά την 10^η ημέρα. Σύμφωνα με την έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Silva, A. P. R. D. et al., (2018) σε MRS broth στους 4 °C παρατηρήθηκε πως το *Lactobacillus plantarum* δεν παρουσίασε καθόλου ανάπτυξη.

Στην παρούσα έρευνα ο πληθυσμός των εντεροβακτηριοειδών ως μονοκαλλιέργεια αλλά και όταν εμβολιάστηκε με *Listeria monocytogenes*, βρέθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης (1 log cfu/cm²) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε από (Sygroulou et al. 2022) βρέθηκε πως στην φυσική μικροχλωρίδα της τσιπούρας υπάρχουν βακτήρια του γένους *Enterobacteriaceae*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας τα κύτταρα των βακτηρίων της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* δεν μπορούν να αναπτύξουν βιοϋμένια κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες. Οι Ndraha N. et al. (2022) παρατήρησαν πως το *E. coli* δεν αναπτύχθηκε στους 5 °C σε μαρούλι. Σύμφωνα με τα

παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα βακτήρια της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* δεν αναπτύσσουν βιοϋμένια σε χαμηλές θερμοκρασίες.

5.Συμπεράσματα

Στην παρούσα έρευνα έγινε προσομοίωσης συνθηκών παρόμοιων με αυτών μιας μονάδας επεξεργασίας τροφίμων, όπου μικροοργανισμοί παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον διότι τα κύτταρα τους μπορεί να βρεθούν στις επιφάνειες της βιομηχανίας όπως είναι κύτταρα του *Listeria monocytogenes* και του *Pseudomonas*., αλλά και των άλλων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών των ιχθύων και σχηματίζουν βιοϋμένια σε επιφάνειες πολυστυρενίου με θρεπτικό υπόστρωμα ιχθύος σε θερμοκρασία που επικρατεί στις μονάδες επεξεργασίας τροφίμων.

Όταν τα στελέχη του *Listeria monocytogenes* βρέθηκαν σε συγκαλλιέργεια με τα δύο *Pseudomonas* παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes* παραμένοντας σε όλη την διάρκεια σε χαμηλότερα επίπεδα από τα *Pseudomonas*. Ενώ στην περίπτωση που το *Listeria monocytogenes* εμβολιάστηκε στην φυσική μικροχλωρίδα ιχθύων δεν παρεμποδίστηκε η ανάπτυξη της, αντιθέτως ευνοήθηκε παρόλο που τα *Pseudomonas spp.* κυριαρχούν.

Σε ζωμό ιχθύος που εμβολιάστηκε με *Listeria monocytogenes* το βιοϋμένιο που δημιουργήθηκε από τα κύτταρα των βακτηρίων της φυσική μικροχλωρίδας του ιχθύος και του *Listeria monocytogenes* είχε τον υψηλότερο τελικό πληθυσμό μαζί με τον πληθυσμό των *Pseudomonas*. Λίγο χαμηλότερος βρέθηκε ο πληθυσμός κυττάρων του βιοϋμένιου των υδροθριοπαραγωγών βακτηρίων. Τα βιοϋμένια από οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύχθηκαν σε πολύ μικρούς αριθμούς ενώ τα εντεροβακτηριοειδή δεν ανέπτυξαν βιοϋμένια καθόλη την διάρκεια των 10 ημερών.

Από την παρούσα παρατήρηση λαμβάνουμε σημαντικά και χρήσιμα στοιχεία για την ανάπτυξη βιοϋμένιου από το *Listeria monocytogenes* είτε σε μόνο καλλιέργεια είτε σε διάφορες μικτές καλλιέργειες, σε επιφάνεια από πολυστυρένιο,

στους 8 °C σε ζωμό ιχθύος. Σίγουρα το αντικείμενο των βιοϋμενίων και ειδικότερα των μεικτών βιοϋμενίων χρήζουν περαιτέρω έρευνα.

6. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

1. Allison, D.G., B. Ruiz, C. San Jose, A. Jaspe, and P. Gilbert. (1998) “Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms”. FEMS Microbiol. Lett. 167:179-184.
2. Austin, J.W., G. Sanders, W.W. Kay, and S.K. Collinson. (1998) “Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation.” FEMS Microbiol. Lett. 162:295-301.
3. Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C., & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries e analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. International Journal of Food Microbiology, 87(3), 239e250.
4. Belessi, C., Gounadaki, A. S, Psomas, A., Skandamis, P. (2011). “Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions.” International Journal of Food Microbiology, 1:25.
5. Benamara, H., Rihouey, C., Jouenne, T., & Alexandre, S. (2011). “Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*.” Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1808(1), 98-105.
6. Boyd, A., and A.M. Chakrabarty (1994) “Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*”. Appi. Environ. Microbiol. 60:2355-2359.
7. Bremer, P. J., Monk, I., and Osborne, C. M. (2001). “Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium spp.*” J. Food Prot. 64, 1369–1376.
8. Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. (2011 a). “Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and orthophthalaldehyde on 77 bacterial strains.” Journal of Hospital Infection 78. 208 - 213.
9. Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. (2017) “A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments.” Food Control. 75:1–13. This reference is important because it is a recent review of relevant issues related to *L. monocytogenes*.
10. Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006). “Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents

and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms”.
Appl. Environ. Micro- biol, 72:3916–3923

11. Caldwell, D.E., D.R. Korber, and J.R. Lawrence. (1992) “Confocal laser scanning microscopy and digital image analysis in microbial ecology.” Adv. Microb. Ecol. 12:1-67.
12. Carpentier, B. (2014) “Biofilms, in: Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier, pp. 259– 265.
13. Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology*, 145(1), 1-8.
14. Carpentier, B., & Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International journal of food microbiology*, 97(2), 111-122.
15. Churchill R., Lee H., Hall C. (2006) “Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food” Journal of Microbiological Methods, 64: 141–170.
16. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). «Biofilms, the customized microniche». Journal of bacteriology, 176(8), 2137-2142.
17. Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999) “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections” Science, 284:1318-1322.
18. Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, and H.M. Lappin-Scott. (1995) “Microbial biofilms” Annu. Rev. Microbiol. 49:711-745.
19. Davies, D.G., M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, and E.P. Greenberg. (1998) “The involvement of cell - to - cell signals in the development of a bacterial biofilm” Science 280:295-298.
20. De Vuyst, L. and B. Degeest. (1999) “Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria.” FEMS Microbiol. Rev. 23:153-177.
21. Delaquis, P.J., D.E. Caldwell, J.R. Lawrence, and A.R. McCurdy (1989) “Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from biofilms on glass surfaces in response to nutrient stress” Microb. Ecol. 18:199-210.
22. Domininghaus, H., Eyerer, P., Elsner, P., Hirth, T., (2005) “Die Kunststoffe Und IhreEigenschaften”. Springer Verlag, Berlin, p. 1549.

23. Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002) «Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms». *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
24. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). "The biofilm matrix." *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
25. Flemming, H.C. (2002) «Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures». *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:629–640
26. Flemming, H.C., Neu, T., Wozniak, D.-J. (2007). «The EPS matrix: the "house of biofilm"». *Journal of Bacteriology*, 189(22):7945-7
27. Flemming, H-C., Wingender, J., Griebe, T., Mayer, C. (2000). «Physico-chemical properties of biofilms». In: *biofilms: recent advances in their study and control*. Evans L.V. (ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 19-34
28. Fuqua, W.C., and E.P. Greenberg (2002) "Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling" *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:685-695.
29. Fuqua, W.C., E.P. Winans, and E.P. Greenberg (1994) "Quorum sensing in bacteria: the Lux R/Lux I family of cell density -responsive transcriptional regulators" *J. Bacteriol.* 176:269-275.
30. Gerstel, U., and U. Romling. (2003) "The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*" *Res. Microbiol.* 154:659-667.
31. Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., (2013) "Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride". *PLoS ONE* 8, e77276.
32. Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., Nychas, G. J. E. (2014 b). "Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods." *Meat Science* 97. 298 - 309.
33. Gjermansen, M., P. Ragas, C. Sternberg, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen. (2005) "Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms." *Environ. Microbiol.* 7(6):894-904.
34. Gotz, F. (2002) "Staphylococcus and biofilms" *Mol. Microbiol.* 43:1367-1378.
35. Gunduz, G. T., & Tuncel, G. (2006) "Biofilm formation in an ice cream plant." *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3e4), 329e336.

36. Guobjornsdottir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson, G. (2005) "Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gram negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*" *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 55e61.
37. Hanna E. S., Wang H. (2007) "Biofilm development by *Listeria monocytogenes*. Biofilms in the food environment" IFT Press, Blackwell Publishing, Ames, IA, 47-71.
38. Hassan, A.N., D.M. Birt, and J.F. Frank. (2004) "Behaviour of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface." *J. Food Protect.* 67(2):322-327.
39. Hazards EP, Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, et al. (2009) "Scientific opinion of the panel on dietetic products, nutrition and allergies". *EFSA J.* NNNN:189.
40. Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz. (1996) "Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*." *Mol. Microbiol.* 20:1083-1091.
41. Høiby, N. (1974). "Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humoral immune response." *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* Section B Microbiology and Immunology, 82(4), 551-558.
42. Hood, S. K. and Zottola E. A. (1995) "Biofilms in food processing: Review." *Food Control.* Vol. 6. No 1. 9 - 18.
43. Ibusquiza, P. S., Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., & Cabo, M. L. (2012) "Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*" *Food Control*, 25(1), 202-210.
44. Johannaber, F., Michaeli, W., (2004) "Handbuch Spritzgießen", fourth ed. Carl Hanser Verlag, München, pp. 1269e1273
45. Jolly, L., Vincent, S. J., Duboc, P., & Neeser, J. R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. "In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*", 1–5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands (pp. 367-374). Springer Netherlands.

46. Kaplan, J. B., C. Ragunath, N. Ramasubbu, and D.H. Fine (2003) "Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity." *J. Bacteriol.* 185:4693-4698.
47. Kells, J., & Gilmour, A. (2004) "Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation." *International journal of food microbiology*, 91(2), 167-174.
48. Korber, D.R., Mangalappalli-Illathu, A.K., Vidović, S., (2009) "Biofilm formation by food spoilage microorganisms in food processing environments, in: *Biofilms in the Food and Beverage Industries*". Elsevier, pp. 169–199.
49. Kuehn, M., M. Hausner, H.-J. Bungartz, M. Wagner, P.A. Wilderer, and S. Wuerztz. (1998) "Automated confocal laser scanning microscopy and semiautomated image processing for analysis of biofilms." *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11):4115-4127
50. Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998) "Significance of microbial biofilms in food industry: a review." *International Journal of Food Microbiology*, 42(1e2), 9e27
51. Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., & Schukken, Y. H. (2010). "Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*." *Journal of dairy science*, 93(6), 2792-2802
52. Lawrence, J.R., D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, and D.E. Caldwell. (1991) «Optical sectioning of microbial biofilms» *J. Bacteriol.* 173:6558-6557.
53. Lebert I. , Robles-Olvera V., Leber A. (2000), "Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat" *International Journal of Food Microbiology*, 61: 27–39
54. Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmacıyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., (2020) "New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life." *Int. J. Food Microbiol.* 318, 108464.
55. Lemon, K.P., D.E. Higgins, and R. Kolter. (2007) "Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation." *J. Bacteriol.* 189(12):4418-4424.
56. Leriche, V., and B. Carpentier. (2000) "Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms." *J. Appl. Microbiol.* 88:594-605.

57. Leriche, V., Briandet, R., Carpentier, B. (2003) "Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another" *Environmental Microbiology*, 5:64–71.
58. Leriche, V., D. Chassaing, and B. Carpentier. (1999) "Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*." *Int. J. Food Microbiol.* 51:169-182.
59. Lewandowski, Z. (2000). «Structure and function of biofilm»s, p. 1–17. In L. V. Evans (ed.), *Biofilms: recent advances in their study and control*. Harwood Academic Publishers
60. Li, Y.H., N. Tang, M.B. Aspiras, P.C.Y. Lau, J.H. Lee, R.P. Ellen, and D.G. Cvitkovitch. (2002) "A quorum sensing signalling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation". *J. Bacteriol.* 184:2699-2708.
61. Lianou, A., Nychas, G.-J.E., Koutsoumanis, K.P., (2020) "Strain variability in biofilm formation: A food safety and quality perspective". *Food Res. Int.* 137, 109424.
62. Lorber B. (2007), "Listeriosis, In: *Listeria monocytogenes* and host response, Goldfine H. and Shen H., Springer Science + Business Media LLC, USA, pp 13-15.
63. Low J. and Donachie W. (1997), "A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis" *The Veterinary Journal*, 153: 9-29.
64. Lundén, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. (2004), "Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe.", *Journal of Dairy Science*, 87, E6-E12
65. Luo, H., K. Wan, and H.H. Wang. (2005) "High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAMβ1 transmission by *Lactococcus lactis*." *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6):2970- 2978.
66. Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and R. Laufs. (1994) "Characterization of transposon mutants of biofilm producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine containing polysaccharide intercellular adhesin." *Infect. Immun.* 62:3244-3253.
67. Maillard, J. Y. (2002). "Bacterial target sites for biocide action." *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 92. 16 - 27.

68. Maniki, E., Kostoglou, D., Paterakis, N., Nikolaou, A., Kourkoutas, Y., Papachristoforou, A., & Giaouris, E. (2023). "Chemical Composition, Antioxidant, and Antibiofilm Properties of Essential Oil from *Thymus capitatus* Plants Organically Cultured on the Greek Island of Lemnos." *Molecules*, 28(3), 1154.
69. Martín, B., Perich, A., Gómez, D., Yangüela, J., Rodríguez, A., Garriga, M., & Aymerich, T. (2014). Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food microbiology*, 44, 119-127.
70. McLauchlin J, Rees CED. *Listeria*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al., editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology—Vol 3: the Firmicutes*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag New York Inc; 2009.
71. McLauchlin, J. (1997a). "The Discovery of *Listeria*". *PHLS Microbiology Digest*, 14, 76-78.
72. McLean, R.J.C., M. Whiteley, D.J. Stickler, and W.C. Fuqua. (1997). "Evidence for autoinducer activity in naturally occurring biofilms." *FEMS Microbiol. Lett.* 154:259-263.
73. Moens, S., and J. Vanderlayden. (1996) "Functions of bacterial flagella." *Crit. Rev. Microbiol.* 22:67- 100
74. Moorhead SM, Dykes GA. (2004) "Influence of the sigB gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes." *Int J Food Microbiol.*91:63–72
75. Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107-121.
76. Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). "A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.)." *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407-439.
77. Ndraha, N., Goh, A. P., Tran, G. D., Chen, C. Q., & Hsiao, H. I. (2022). "Predictive models for the growth of *Salmonella* spp., *Listeria* spp., and *Escherichia coli* in lettuce harvested on Taiwanese farms." *Journal of Food Science*, 87(8), 3599-3610.
78. O'Toole, G.A., and R. Kolter. (1998a) "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." *Mol. Microbiol.* 30:295-304.
79. O'Toole, G.A., H.B. Kaplan, and R. Kolter. (2000) "Biofilm formation as microbial development" *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.

80. Pang, X., Wong, C., Chung, H. J., & Yuk, H. G. (2019) "Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and its resistance to quaternary ammonium compounds in a simulated salmon processing environment." *Food Control*, 98, 200-208.
81. Papaioannou, E., Giaouris, E. D., Berillis, P., & Bozaris, I. S. (2018). "Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges." *International journal of food microbiology*, 267, 9-19.
82. Parish, M. E., & Higgins, D. P. (1989) "Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems." *Journal of Food Protection*, 52(3), 144-147.
83. Pérez-Rodríguez F, Valero A, Carrasco E, García RM, Zurera G. (2018) "Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review" *Trends Food Sci Technol*.19:131–44.
84. Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat (RTE) foods. Health Canada, Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, Health Products and Food Branch; 2011; April:1–37
85. Pratt, L.A., and R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30(2):285-293
86. Prouty, A.M., W.H. Schwesinger, and J.S. Gunn. (2002) "Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella spp.*" *Infect. Immun.* 70:2640-2649.
87. Rebagliati, V., Philippi, R., Rossi, M., & Troncoso, A. (2009), "Prevention of foodborne listeriosis.", *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 52(2), 145.
88. Romling, U., and M. Rohde. (1999) "Flagella modulate the multicellular behaviour of *Salmonella typhimurium* on the community level." *FEMS Microbiol. Lett.* 180:91-102.
89. Romling, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark, and J. Reinkoster. (2000) "AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways." *Mol. Microbiol.* 36(1): 10-23.
90. Ruas-Madiedo, P., M. Gueimonde, A. Margelles, C.G. de los Reyes-Gavillan, and S. Salminen. (2006) "Exopolysaccharides produced by probiotics strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus." *J. Food Prot.* 69(8):2011-2015.

91. Rückerl, I., Muhterem-Uyar, M., Muri-Klinger, S., Wagner, K. H., Wagner, M., & Stessl, B. (2014). *L. monocytogenes* in a cheese processing facility: learning from contamination scenarios over three years of sampling. *International journal of food microbiology*, 189, 98-105.
92. Sasahara, K. C., & Zottola, E. A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of food protection*, 56(12), 1022-1028
93. Seeliger, H. P. R., & Jones, D. (1986) "Genus *Listeria* Pirie." *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 1235-1245.
94. Sharma, M., & Anand, S. K. (2002) "Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry—a case." *Food control*, 13(6-7), 469-477.
95. Shirtliff, M.E., J.T. Mader, and A.K. Camper. (2002) "Molecular interactions in biofilms." *Chem. Biol.* 9:859-871.
96. Silva, A. P. R. D., Longhi, D. A., Dalcanton, F., & Aragão, G. M. F. D. (2018). "Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures." *Brazilian archives of biology and technology*, 61.
97. Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2010) "A review of current and emergent biofilm control strategies." *LWT - Food Science and Technology* 43. 573 - 583.
98. Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2008). "Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses." *International journal of food microbiology*, 128(2), 309-316.
99. Steidle, A., K. Sigi, R. Schuegger, A. Hirling, M. Schmid, S. Gantner, M. Stoffels, K. Riedel, M. Givskov, A. Hartmann, C. Langebartels, and L. Eberl. (2001) "Visualization of Vacylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere." *Appi. Environ. Microbiol.* 67:5761-5770.
100. Stoodley, P., D. Debeer, and Z. Lewandowski. (1994) "Liquid flow in biofilm systems." *Appi. Environ. Microbiol.* 60:2711-2716.
101. Stoodley, P., K. Sauer, D.G. Davies, and J.W. Costerton. (2002) "Biofilms as complex differentiated communities." *Annu. Rev. Microbiol.* 56:187-209.

102. Stoodley, P., R. Cargo, C.J. Rupp, S. Wilson, and I. Klapper. (2002) "Biofilm mechanics and shear induced deformation and detachment." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29:361-368. 578.
103. Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and infection*, 9(10), 1236-1243.
104. Syropoulou, F., Anagnostopoulos, D. A., Parlapani, F. F., Karamani, E., Stamatiou, A., Tzokas, K., ... & Bozaris, I. S. (2022). Microbiota succession of whole and filleted european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during storage under aerobic and MAP conditions via 16S rRNA gene high-throughput sequencing approach. *Microorganisms*, 10(9), 1870.
105. Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). "Environmental factors that shape biofilm formation." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(1), 7-12.
106. Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2010) "Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants." *Ann. Microbiol.* 60, 549–556.
107. Vatanyoopaisarn, S., A. Nazli, C.E.R. Dodd, C.E.D. Rees, and W.M. Waites. (2000) "Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel." *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2):860-863.
108. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. (2011). "Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture." *International Journal of Food Microbiology* 145. 37 - 42.
109. Vogel, B. F., Hansen, L. T., Mordhorst, H., & Gram, L. (2010) "The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material." *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 192-200.
110. Welman, A.D., and I.S. Maddox. (2003) "Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges." *TRENDS Biotechnol.* 21(6):269-274.
111. White, A.P., D.L. Gibson, W. Kim, W.W. Kay, and M.G. Surette. (2006) "Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*." *J. Bacteriol.* 188(9):3219-3227.
112. Wingender, J., T.R. Neu, and H.C. Flemming. (1999) "What are bacterial extracellular polymeric substances?" In: Wingender, J., T.R. Neu, and H.C. Flemming

(Ed.). Microbial extracellular polymeric substances, pp. 1-19. Springer, Berlin, Germany.

113. Wirtanen, G., Salo, S., (2016) “Biofilm Risks, in: Handbook of Hygiene Control in the Food Industry.” Elsevier, pp. 55–79.
114. Woodward, M.J., M. Sojka, K.A. Sprigings, and T.J. Humphrey. (2000) “The role of SEFI4 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces.” J. Med. Microbiol. 49:481-487.
115. Wünsch, J.R., (2000) “Polystyrene: Synthesis, Production and Applications.” Rapra Technology, Shropshire, pp. 1e28.
116. Yoshida, A., and H.K. Kuramitsu. (2002) “Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation.” Appl. Environ. Microbiol. 68:6283-6291.
117. Zobell, C.E. (1943) “The effect of solid surfaces upon bacterial activity.” J. Bacteriol. 46:39-56.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

1. Center for Biofilm Engineering, Montana State University, USA, <http://www.erc.montana.edu>
2. Commission E. Commission Regulation (EC) N0. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Off. J. Eur. Communities. 2005;338:1–26. Available from: [https:// www.fsai.ie/uploadedFiles/Consol_Reg2073_2005.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Consol_Reg2073_2005.pdf)
3. Cruz CD, Fletcher GC. (2011) “Prevalence and biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes* in New Zealand mussel (*Perna canaliculus*) processing plants” Food Microbiol, 28:1387– 93. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.014>.
4. European Food Safety Authority. (2016) “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015.” EFSA J. 14. Available from: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
5. European Food Safety Authority. The European Union One Health (2022) “Zoonoses Report” (<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>)
6. Guidance on the application of microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in RTE food The Australian and New Zealand food standards system Food standards Australia New Zeland. 2014: 1–13. Available from: <http://www>.

foodstandards.gov.au/foodsafety/standards/Pages/Microbiological-limits-for-food-(Standard-1.6.1).aspx

7. <https://www.sarstedt.com/en/products/laboratory/general-laboratory-products/micro-test-plates/product/82.1581.001/>
8. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, (2011) Foodborne illness acquired in the United States— major pathogens. *Emerg Infect Dis.*17:7–15. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/1/p1-1101_article
9. Verification Activities for the *Listeria monocytogenes* (Lm) Regulation and the Ready-to-Eat (RTE) Sampling Program Washington D.C.: United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service; 2014. Available from: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/b8cd03ed-222c-4cef-ad92-3647e3be6c53/10240.4.pdf?MOD=AJPERES>
10. Zhang Q, Feng Y, Deng L, Feng F, Wang L, Zhou Q, et al. (2011) “SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress.” *Int J Food Microbiol.*145:238–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.028>.